

## 보육시설 급식실 실내공기에서 분리된 식중독 세균의 독소 유전자 및 독소 생산 특성

김중범 · 김종찬\*†

경기도보건환경연구원 보건연구부, \*서울과학기술대학교 환경공학과

### Toxin Gene Profiles and Toxin Production Ability of Food-borne Pathogens Isolated from Indoor Air from Lunchrooms at Child Care Centers

Jung-Beom Kim and Jong-Chan Kim\*†

Health Research Department, Gyeonggi-do Institute of Health & Environment, Suwon, Korea

\*Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives:** This study was conducted in order to evaluate the microbiological contamination of the indoor air of the lunchrooms at child care centers and investigate the toxin genes and toxin production ability of food-borne pathogens.

**Methods:** A total of 64 child care centers were sampled to test total aerobic bacteria, coliform bacteria, fungi, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* spp. according to the Korea Food Code. All toxin genes of pathogens were detected using the Polymerase Chain Reaction method. The *Staph. aureus* enterotoxin was detected by a *Staphylococcus aureus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit. The heamolysin BL (HBL) and non-heamolytic enterotoxin (NHE) produced by *B. cereus* were detected using a *B. cereus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit and *Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay kit, respectively.

**Results:** The means of total aerobic bacteria and coliform bacteria were  $1.91 \pm 1.84$  log CFU/plate and  $0.47 \pm 0.62$  log CFU/plate, respectively. The mean of fungi also showed  $0.59 \pm 0.71$  log CFU/plate. Among the pathogenic bacteria tested in this study, *Staphy. aureus* and *B. cereus* were detected in four (6.3%) and 21 (32.8%) out of 64 indoor air samples from lunchrooms in child care centers, respectively. All *Staphy. aureus* tested in this study possessed no toxin genes and did not produce enterotoxin. The detection rate of *nheABC*, *hblCDA*, *entFM* and *ces* toxin gene in *B. cereus* was 100, 57.1, 76.2 and 0%, respectively. *B. cereus* isolates were classified into four groups according to the presence or absence of toxin genes. The *nheABC* gene was the major toxin gene among *B. cereus* tested in this study. The HBL was detected in 11 out of 21 *B. cereus* isolates (52.4%) and three *B. cereus* isolates produced NHE (14.3%).

**Conclusion:** The results indicated that the contamination by microorganisms in the indoor air of lunchrooms was unqualified to supply safe catering in child care centers. The ongoing control of indoor air quality is required.

**Keywords:** child care center, indoor air, food-borne pathogens, toxin characteristics

#### I. 서 론

우리나라는 세계적으로 가장 낮은 출산율을 나타

내고 있으며 이러한 저 출산 문제는 여성의 경제 활동 증가와 이에 따른 육아 부담 및 과도한 교육비 지출로 인한 경제적 이유에 기인하는 것으로서 영유

†Corresponding author: Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Korea, Tel: +82-2-970-6619, Fax: +82-2-971-5776; E-mail: kjs2580@seoultech.ac.kr

Received: 12 November 2012, Revised: 22 November 2012, Accepted: 28 November 2012

아 보육은 가정뿐만 아니라 국가도 함께 책임져야 한다는 인식이 증가하고 있다.<sup>1,2)</sup> 이러한 사회적 현상을 극복하고자 정부에서는 보육시설의 양적인 확충과 함께 보육 서비스의 질적인 향상을 지속적으로 추진하여 보육시설은 2010년 현재 38,021개소로서 1990년에 비하여 19배 증가하였고 보육 영유아수는 1,279,910명으로 266배 증가하였다.<sup>3)</sup> 보육 서비스의 질적 향상을 위해 종일제 학급을 운영하여 심야까지 영유아를 보육하고 있으며, 어린이집 등 보육시설에서는 단체급식을 제공하고 있다.<sup>4)</sup> 보육시설은 초등학교 입학 전까지 면역체계가 완전하게 발달하지 않은 영유아를 보육 대상으로 하고 보육시설 내 실내 환경의 경우 외부공기 순환이 제한적이고 햇빛에 대한 노출이 적어 공기 중 미생물이 장기간 생존할 확률이 있어<sup>5)</sup> 보육시설의 급식실 실내 환경의 각별한 위생관리가 필요하다.<sup>6-8)</sup> 그러나 한정된 공간과 정부 지원으로 대부분의 어린이집에서는 보육실에서 보육과 급식을 함께 제공하고 있다.

단체급식 및 외식의 증가와 지구온난화로 인해 식품위생 및 안전에 관한 소비자 인식이 강화되었음에도 불구하고 국내 집단 식중독은 지속적으로 발생하여 2010년 271건 7,218명으로 2002년에 비하여 발생건수는 3.5배, 환자수는 2.5배 증가하였다.<sup>9)</sup> 2010년 원인시설별 식중독발생 보고를 분석해 보면 음식점 49.0%, 집단급식소 19.5%, 가정집 1.1%로 집단급식시설이 주요 식중독 발생장소로 보고되고 있다.<sup>9)</sup> 집단급식시설의 식중독 발생 원인은 조리기구 등에 의한 교차오염과<sup>10)</sup> 시설·설비의 부족이 주요원인으로 보고되고 있으며,<sup>11)</sup> 주요 오염원은 식자재, 종사자, 공기 등 이라고 보고되고 있다.<sup>12)</sup> 또한, 집단식중독을 예방하기 위해서는 식품취급 중 위생사항 준수, 개인위생 및 환경위생관리가 함께 이루어져야 한다고 보고되고 있다.<sup>12)</sup> 따라서 어린이집 급식실 실내공기의 미생물관리 등 환경위생관리가 적절히 유지되지 않으면 낙하세균에 의한 식중독 발생 가능성이 상존한다 하겠다. 그러나 현재까지의 연구 동향을 살펴보면 초등학교 및 고등학교 실내 환경에서 공기 중 미생물 분리 및 특성,<sup>13,14)</sup> 사무실 등 공중이용시설 실내 공기 중 생물학적 오염 평가,<sup>12,15)</sup> 노인요양시설과 병원 실내공기 중 미생물 오염 연구<sup>16,17)</sup> 등 교육 및 시설별 실내 환경에 대한 미생물학적 오염분석에 국한되어 있다. 어린이집 등 보육시설에 관

한 연구는 유치원 실내 환경에서 공기 중 미생물 수의 계절적 변화만이 연구되어<sup>5)</sup> 있을 뿐 어린이가 급식을 섭취하는 급식실의 실내공기 중 미생물 오염도와 독소 생산 특성에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 어린이집 급식실 실내공기 중 위생지표 미생물과 식중독 세균 오염도를 측정하고 분리균주의 독소 유전자 및 독소 생산 특성을 분석하여 어린이집 영유아들이 안전한 실내 환경에서 급식을 제공 받을 수 있는 방안을 제시하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험대상 보육시설

수도권 소재 국공립 어린이집 15개소와 민간 어린이집 49개소 총 64개소의 어린이집을 실험대상 보육시설로 선정 하였다. 대부분의 어린이집은 공간적 제약으로 인해 급식실을 별도로 운영하고 있지 않으며 보육실에서 보육과 함께 급식을 제공하고 있어 각각의 어린이집의 점심 급식시간에 보육실 실내공기를 실험대상으로 하였다.

### 2. 급식실 공기 중의 낙하세균 채취

급식실의 실내공기가 단체급식의 식품안전성에 미치는 영향을 파악하기 위하여 식품공전에서<sup>18)</sup> 제시하는 배지를 이용하여 실내공기 중 낙하세균을 측정하였다. 식품위생 지표 미생물을 측정하고자 일반세균의 경우 Standard Plate Count agar (PCA; Difco, USA), 대장균군의 경우 Desoxycholate Lactose agar (DLA; Difco, USA), 진균의 경우 Potato Dextrose agar (PDA; Difco, USA)를 사용하였으며 식중독 세균을 측정하고자 *Salmonella* spp.는 MacConkey agar (MaC; Oxoid, England), *Staphylococcus aureus*는 난황첨가 Baird-Parker agar (BPA; Oxoid, England), *Bacillus cereus*는 Mannitol-Egg York-Polymyxin agar (MYP; Oxoid, England)를 사용하였다. 각각의 배지는 어린이들이 급식에 사용하는 높이가 50-60 cm인 책상에 뚜껑을 열어 5분간 공기에 노출시켜 낙하세균을 포집한 후 뚜껑을 닫아 실험실로 운반하여 배양하였다.<sup>12,19)</sup>

### 3. 일반세균수, 대장균군수 및 진균수 측정

일반세균수, 대장균군수 및 진균수의 측정은 식품

**Table 1.** Primer sequences and reaction conditions for the PCR of *Bacillus cereus* toxin genes

Amplification target	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reaction condition
<i>nheB</i>	TTTAGTAGTGGATCTGTACGC TTAATGTTCGTTAATCCTGC	743	94C, 2 min → (94C, 60 sec → 54C, 60 sec → 72C, 120 sec) 35 cycle → 2C, 5 min
<i>nheC</i>	TGGATTCCAAGATGTAACG ATTACGACTTCTGCTTGTGC	683	
<i>hblA</i>	AAGCAATGGAATACAATGGG AGAATCTAAATCATGCCACTGC	1,154	94C, 2 min → (94C, 60 sec → 56C, 60 sec → 72C, 120 sec) 35 cycle → 2C, 5 min
<i>nheA</i>	GTTAGGATCACAATCACC GC ACGAATGTAATTTGAGTCGC	755	
<i>hblC</i>	GATACTCAATGTGGCAACTGC TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG	740	94C, 2 min → (94C, 60 sec → 58C, 60 sec → 72C, 120 sec) 35 cycle → 2C, 5 min
<i>hblD</i>	ACCGGTAACACTATTCATGC GAGTCCATATGCTTAGATGC	829	
<i>entFM</i>	AAAGAAATTAATGGACAAACTCAA ACTCA GTATGTAGCTGGGCCTGTACGT	596	95C, 3 min → (95C, 30 sec → 60C, 30 sec → 72C, 60 sec) 35 cycle → 2C, 5 min
<i>ces</i>	GGTGACACATTATCATATAAGGTG GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	1,271	95C, 15 min → (95C, 60 sec → 58C, 75 sec → 72C, 50 sec) 25 cycle → 2C, 5 min

공전에서<sup>18)</sup> 제시하는 실험법에 따라 측정하였다. 일반세균수는 PCA (Difco, USA) 배지를 35°C에서 48시간 배양하여 형성된 집락을 계수하여 측정하였고 대장균수는 DLA (Difco, USA) 배지를 35°C에서 24시간 배양하여 적색의 전형적인 집락을 계수하여 측정하였다. 진균수는 PDA (Difco, USA) 배지를 25°C에서 5일간 배양하여 형성된 집락을 계수하여 측정하였다.

#### 4. 식중독 세균 측정 및 분리 동정

식중독 세균은 식품공전에<sup>18)</sup> 따라 실험하였으며 *Salmonella* spp.는 MaC 배지를 35°C에서 24시간 배양한 결과 흰색 집락을 계수하여 *Salmonella* spp. 균수를 측정하였다. 흰색 집락 5개를 선별하여 각각을 Tryptic Soy agar (TSA; Oxoid, England)에 희석 도달한 후 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양된 집락에 대하여 살모넬라 O 혼합혈청 응집실험을 실시하여 혈청응집 양성반응을 나타낸 집락에 대하여 API 20E (bioMerieux, France)를 이용하여 *Salmonella* spp.를 동정하였다.

*Staphy. aureus*는 BPA 배지를 35°C에서 24시간 배

양하여 검은색 집락과 주변에 혼탁한 백색환을 나타내는 집락을 계수하여 *Staphy. aureus* 균수를 측정하였다. 전형적인 집락을 선별하여 TSA (Oxoid, England)에 도달하여 35°C에서 24시간 배양한 후 Coagulase test (Staphylase, Oxoid, England)를 실시하여 응고가 일어나면 API Staph test kit (bioMerieux, France)를 이용 생화학적으로 *Staphy. aureus*를 동정하였다.

*B. cereus*는 MYP 배지를 35°C에서 24시간 배양한 후 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 계수하여 측정하였다. 전형적인 집락을 선별하여 TSA (Oxoid, England)와 Blood agar (Komed, Korea)에 도달하였으며, β-heamolysis를 나타내는 균주에 대하여 Gram stain, Catalase test를 실시한 후 API 50CHB와 API 20E test kit (bioMerieux, France)를 이용 생화학실험을 하여 *B. cereus*를 동정하였다.

#### 5. 식중독 세균의 독소 유전자 및 독소 생산 특성

*Staphy. aureus*와 *B. cereus*의 독소 유전자를 확인하기 위하여 동정된 식중독 균주를 TSA (Oxoid, UK)에 도달하여 35°C에서 24시간 배양한 후 한 개의 집

**Table 2.** Microbiological evaluation of indoor-air at lunchroom in child care center

Type	Total aerobic bacteria		Coliform bacteria		Fungi	
	Range <sup>1)</sup>	Mean $\pm$ SD <sup>2)</sup>	Range	Mean $\pm$ SD	Range	Mean $\pm$ SD
Public center(n=15)	0.70 ~ 2.40	1.96 $\pm$ 1.91	ND <sup>3)</sup> ~ 0.95	0.40 $\pm$ 0.47	ND ~ 1.26	0.59 $\pm$ 0.71
Private center(n=49)	0.48 ~ 2.49	1.89 $\pm$ 1.82	ND ~ 1.26	0.49 $\pm$ 0.65	ND ~ 1.46	0.63 $\pm$ 0.75
Total(n=64)	0.48 ~ 2.49	1.91 $\pm$ 1.84	ND ~ 1.26	0.47 $\pm$ 0.62	ND ~ 1.46	0.62 $\pm$ 0.74

<sup>1)</sup> Unit: log CFU / plate / 5 min.

<sup>2)</sup> SD: Standard deviation.

<sup>3)</sup> ND: Not detected.

락을 취하여 멸균증류수 500  $\mu$ L가 첨가된 멸균 튜브에 부유 시켰다. 균주를 부유시킨 튜브를 100°C에서 10분간 열처리하고 13,000  $\times$ g에서 10분간 원심분리한 후 상층액 100  $\mu$ L를 취하여 Spectrophotometer (BioPhotometer; Eppendorf, Germany)를 이용 260 nm에서 DNA 농도를 측정하였고 DNA 농도가 1  $\mu$ g/mL가 되도록 각각의 튜브를 멸균증류수로 희석하여 template DNA로 사용하였다. *Staphy. aureus* 독소 유전자는 PowerChek™ *Staphy. aureus* toxin ID PCR Kit (Kogenbiotech, Korea)를 이용 확인하였으며 Polymerase Chain Reaction (PCR) 조건은 94°C, 2 min  $\rightarrow$  (94°C, 60 sec  $\rightarrow$  54°C, 60 sec  $\rightarrow$  72°C, 120 sec) 35 cycle  $\rightarrow$  72°C, 5 min으로 제조사가 권장하는 방법에 따라 실험하였다. *B. cereus* 독소 유전자 확인 실험에 사용된 primer sequences와 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다.<sup>20)</sup> PCR 반응은 AccuPower™ PCR Premix (Bioneer, Korea)를 사용하였으며 그 조성은 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M dNTP, 10 pM primer, 2 U Taq polymerase와 5  $\mu$ L template DNA가 되도록 하였다. PCR 반응은 MJ Research thermal cycler (PTC-100; MJ Research, USA)를 이용하였으며 전기영동은 PCR product를 2% agarose gel에 loading한 후 110 V에서 40분간 실시하였다. 독소 유전자 확인은 agarose gel을 0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide solution에 5분간 침지하여 염색한 후 UV transilluminator (Gel Doc 2000; Bio-Rad, USA)를 이용 각각의 밴드를 확인하였다.<sup>20)</sup> PCR 실험의 대조균주로는 *Staphy. aureus* ATCC 25922 및 *B. cereus* 14579와 F4810/72를 사용하였다.

*Staphy. aureus*와 *B. cereus* 균주의 독소 생산 능력을 확인하기 위하여 분리균주를 Tryptic Soy broth

(TSB; Oxoid, England)에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 3000  $\times$ g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 독소 생산 능력 실험에 사용하였다. *Staphy. aureus*의 독소 생산 능력은 *Staphylococcus aureus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit (SET-RPLA; Denka Seiken, Japan)를 이용하였으며, *B. cereus*의 독소 중 heamolysin BL enterotoxin (HBL) 생산 능력은 *B. cereus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit (BCET-RPLA; Oxoid, England)를 사용하였고, non-heamolytic enterotoxin (NHE)은 *Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay kit (BDE-VIA; Tecra international Pty Ltd., Australia)를 사용하였다.<sup>16)</sup>

### III. 결 과

#### 1. 보육시설 급식실 실내공기 중 미생물 오염도

어린이집 급식실의 실내공기 중 미생물 오염도를 분석하고자 일반세균수, 대장균수 및 진균수를 실험하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 일반세균수의 경우 평균 1.91 $\pm$ 1.84 log CFU/plate로 검출되었고 10' 범위가 59.4%로 가장 높은 분포를 나타내었으며 국공립어린이집 평균 1.96 $\pm$ 1.91 log CFU/plate, 민간어린이집 평균 1.89 $\pm$ 1.82 log CFU/plate 검출되어 설립주체에 따른 어린이집 실내공기 중 일반세균수 오염도 차이는 미미하였다. 위생지표미생물인 대장균의 경우 공립어린이집 15개소 중 10개소 (66.7%)와 민간어린이집 49개소 중 32개소 (65.3%), 전체 64개소 중 42개소 (65.6%)에서 검출되었으며, 공립어린이집 평균 0.40 $\pm$ 0.47 log CFU/plate, 민간어린이집 평균 0.49 $\pm$ 0.65 log CFU/plate로 전체 평균 0.47 $\pm$ 0.62 log CFU/plate를 나타내어 설

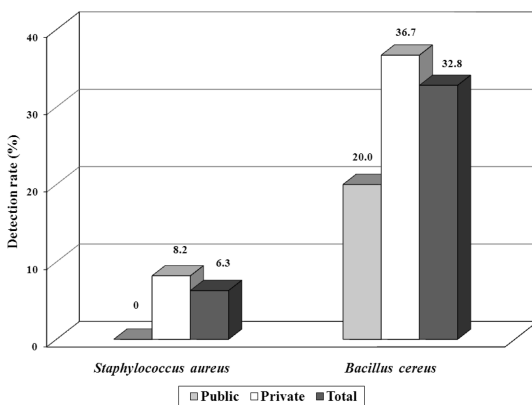
**Table 3.** Food-born pathogens evaluation of indoor-air at lunchroom in child care center

Type	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Salmonella</i> spp.	
	Range <sup>1)</sup>	Mean $\pm$ SD <sup>2)</sup>	Range	Mean $\pm$ SD	Range	Mean $\pm$ SD
Public center(n=15)	ND <sup>3)</sup>	-	ND ~ 1.18	0.27 $\pm$ 0.66	ND	-
Private center(n=49)	ND ~ 1.76	0.40 $\pm$ 1.00	ND ~ 1.65	0.75 $\pm$ 1.04	ND	-
Total(n=64)	ND ~ 1.76	0.28 $\pm$ 0.95	ND ~ 1.65	0.68 $\pm$ 1.00	ND	-

<sup>1)</sup> Unit: log CFU / plate / 5 min.

<sup>2)</sup> SD: Standard deviation.

<sup>3)</sup> ND: Not detected.



**Fig. 1.** Detection rate(%) of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* at indoor-air of lunchroom in child care center.

립주체에 따른 오염도 차이는 미미하였으며, 대장균군 오염도는 일반세균에 비하여 낮은 오염도를 나타내었다. 진균수의 경우 국공립어린이집 15개소 중 9개소 (60.0%), 민간어린이집 49개소 중 30개소 (61.2%), 전체 64개소 중 39개소 (60.9%)에서 검출되었으며, 국공립어린이집 평균  $0.59 \pm 0.71$  log CFU/plate, 민간어린이집 평균  $0.63 \pm 0.75$  log CFU/plate로 전체 평균  $0.62 \pm 0.74$  log CFU/plate를 나타내어 어린이집 급식실 실내공기 중 일반세균수가 가장 높은 오염도 나타내었다.

## 2. 보육시설 급식실 실내공기 중 식중독 세균 오염도

어린이집 급식실의 실내공기 중 식중독 세균 오염도를 분석하고자 *Salmonella* spp., *Staphy. aureus*, *B. cereus*를 실험하였으며, 그 결과는 Table 3과 Fig. 1에 나타내었다. *Salmonella* spp.의 경우 국공립어린이집과 민간어린이집 모두에서 검출되지 않았고 *Staphy. aureus*의 경우 공립어린이집 15개소에서 모

두 검출되지 않았지만 민간어린이집 49개소 중 4개소 (8.2%)에서 검출되어 전체 평균 6.3%의 검출율을 나타내었으며 민간어린이집 평균  $0.40 \pm 1.00$  log CFU/plate를 나타내었고 전체 평균  $0.28 \pm 0.95$  log CFU/plate를 나타내어 민간어린이집이 국공립어린이집 보다 높은 오염도를 나타내었다. *B. cereus*의 경우 국공립어린이집 15개소 중 3개소 (20.0%), 민간어린이집 49개소 중 18개소 (36.7%), 전체 64개소 중 21개소 (32.8%)에서 검출되었으며, 국공립어린이집 평균  $0.27 \pm 0.66$  log CFU/plate, 민간어린이집 평균  $0.75 \pm 1.04$  log CFU/plate로 전체 평균  $0.68 \pm 1.00$  log CFU/plate를 나타내어 어린이집 급식실 실내공기의 식중독 세균 중 *B. cereus*가 가장 높은 오염도 나타내었다.

## 3. 식중독 세균의 독소 유전자 및 독소 생산 특성

분리 동정된 *Staphy. aureus*와 *B. cereus* 식중독 세균의 식중독 유발 위험성을 분석하고자 독소 유전자와 독소 생산 능력 확인 실험을 실시하였으며 *B. cereus*의 독소 유전자 분포는 Table 4에 나타내었다. 민간어린이집 급식실 실내공기에서 분리된 *Staphy. aureus* IAS-3333, IAS-6900, IAS-9289 및 IAS-WJ88 균주의 독소 유전자 실험결과 *sea~seq* 등 총 18종의 독소 유전자가 모두 검출되지 않았으나 *B. cereus*의 경우 Non-heamolytic enterotoxin (NHE)를 생산하는 *nheABC* 유전자가 21균주 모두에서 검출되어 100%의 검출율을 나타내었으며 Hemolysin BL (HBL)를 생산하는 *hblCDA* 유전자는 21균주 중 12균주 (57.1%)에서 검출되었고 *entFM* 독소 유전자는 21균주 중 16균주 (76.2%)에서 검출되었다. 구토 독소를 생산하는 *ces* 유전자는 분리된 *B. cereus* 모든 균주에서 검출되지 않아 구토형 식중독 발생 위험성은 미약한 것으로 나타났다. *B. cereus*의 독소

**Table 4.** Detection of toxin genes in *Bacillus cereus* isolated from indoor-air at lunchroom in child care center

Isolates	<i>nheABC</i> <sup>1)</sup>	<i>hblCDA</i> <sup>2)</sup>	<i>entFM</i>	<i>ces</i>
IAB-0230	+ <sup>3)</sup>	+	+	- <sup>4)</sup>
IAB-0927	+	-	+	-
IAB-1003	+	+	-	-
IAB-1234	+	+	+	-
IAB-1395	+	-	-	-
IAB-1518	+	+	+	-
IAB-2162	+	+	-	-
IAB-2250	+	-	+	-
IAB-2894	+	-	+	-
IAB-3054	+	-	+	-
IAB-3333	+	-	+	-
IAB-3726	+	+	+	-
IAB-5157	+	+	+	-
IAB-5625	+	+	+	-
IAB-8030	+	+	+	-
IAB-8426	+	+	+	-
IAB-8813	+	+	+	-
IAB-9093	+	+	-	-
IAB-BF11	+	-	+	-
IAB-WJ88	+	-	+	-
IAB-YJ61	+	-	-	-

<sup>1)</sup> *nheABC*: *nhe A, B* and/or *C*.  
<sup>2)</sup> *hblCDA*: *hbl C, D* and/or *A*.  
<sup>3)</sup> +: Detected.  
<sup>4)</sup> -: Not detected.

유전자 패턴을 분석한 결과는 Table 5에 나타내었으며 총 4개 그룹으로 구분되었다. 4개 그룹 중 가장 높은 빈도를 나타낸 그룹은 *nheABC* + *hblCDA* + *entFM* 독소 유전자를 함유하는 Pattern I로 21균주 중 9균주 (42.9%)가 포함되었으며 *nheABC* + *hblCDA* 독소 유전자를 함유하는 Pattern II는 21균주 중 3균주 (14.3%)로 나타났다. 두 번째로 높은 빈도를 나타낸 그룹은 *nheABC* + *entFM* 독소 유전자를 함유하는 Pattern III으로 21균주 중 7균주 (33.3%)가 포함되었고 가장 낮은 빈도를 나타낸 그룹은 *nheABC* 독소 유전자만 함유하는 Pattern IV로 21균주 중 2

**Table 5.** Different toxin gene profiles of *Bacillus cereus* isolated from indoor-air at lunchroom in child care center

Pattern	<i>nheABC</i>	<i>hblCDA</i>	<i>entFM</i>	<i>ces</i>	No (%) of strains (n=21)
I	+	+	+	-	9 (42.9)
II	+	+	-	-	3 (14.3)
III	+	-	+	-	7 (33.3)
IV	+	-	-	-	2 (9.5)

**Table 6.** Toxin production of *Staphylococcus aureus* isolated from indoor-air at lunchroom in child care center

Toxin <sup>1)</sup>	Enterotoxin			
	A	B	C	D
IAS-3333	- <sup>2)</sup>	-	-	-
IAS-6900	-	-	-	-
IAS-9289	-	-	-	-
IAS-WJ88	-	-	-	-

<sup>1)</sup> *Staphylococcus aureus* enterotoxin reversed passive latex agglutination (SETRPLA) was used to detect enterotoxin of *Staphylococcus aureus*.  
<sup>2)</sup> -: Not detected.

균주 (9.5%)가 포함되었다. *B. cereus*의 독소 유전자를 분석한 결과 NHE 독소를 생산하는 *nheABC* 독소 유전자가 가장 높은 검출을 나타내었다.

*Staphy. aureus*의 독소 생산 능력은 Table 6에 나타내었고 *B. cereus*의 독소 생산 능력은 Table 7에 나타내었다. 민간어린이집 급식실 실내공기에서 분리된 *Staphy. aureus* 4균주의 독소 생산 능력을 실험한 결과는 독소 유전자 실험결과와 동일하게 SEA, SEB, SEC 및 SED 4 종류의 독소 모두가 검출되지 않았다. *B. cereus* 독소 실험결과 HBL 독소는 분리된 21균주 중 *B. cereus* IAB-0230 등 11균주 (52.4%)에서 검출되었으며, NHE 독소는 21균주 중 *B. cereus* IAB-BF11 등 3균주 (14.3%)에서 검출되었고 HBL과 NHE 독소 중 하나 이상을 생산하는 *B. cereus* 균주는 총 13 균주 (61.9%)로 나타났다. 특히, 분리된 21균주의 *B. cereus* 중 *B. cereus* IAB-9093 1균주 (4.8%)는 HBL 독소와 NHE 독소를 동시에 생산하는 것으로 나타났다. *Staphy. aureus*와 *B. cereus* 식중독 세균의 독소 생산 능력을 실험한

**Table 7.** Toxin production of *Bacillus cereus* isolated from indoor-air at lunchroom in child care center

Isolates	Enterotoxin	
	NHE <sup>1)</sup>	HBL <sup>2)</sup>
IAB-0230	- <sup>3)</sup>	+ <sup>4)</sup>
IAB-0927	-	-
IAB-1003	-	+
IAB-1234	-	+
IAB-1395	-	-
IAB-1518	-	+
IAB-2162	-	+
IAB-2250	-	-
IAB-2894	-	-
IAB-3054	-	-
IAB-3333	-	-
IAB-3726	-	+
IAB-5157	-	+
IAB-5625	-	+
IAB-8030	-	-
IAB-8426	-	+
IAB-8813	-	+
IAB-9093	+	+
IAB-BF11	+	-
IAB-WJ88	+	-
IAB-YJ61	-	-

<sup>1)</sup> *Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay (BDE-VIA) kit was used to detect non-heamolytic enterotoxin of *Bacillus cereus*.

<sup>2)</sup> *Bacillus cereus* enterotoxin reversed passive latex agglutination (BCET-RPLA) was used to detect heamolysin BL enterotoxin of *Bacillus cereus*.

<sup>3)</sup> -: Not detected.

<sup>4)</sup> +: Detected.

결과 *Staphy. aureus*에 비해 *B. cereus*의 독소 생산 능력이 높게 나타나 어린이집 급식실 실내공기 중 *B. cereus*에 의한 식중독 발생 위험성이 *Staphy. aureus*에 비해 높은 것으로 나타났다.

#### IV. 고 찰

어린이집 급식실 실내공기 중 일반세균 오염도가 평균 1.91±1.84 log CFU/plate로 나타난 것은 동일한 실험방법과 노출시간으로 휴게음식점 주방의 낙

하세균을 측정된 결과 1.15~1.30 log CFU/plate를 나타내었다는 보고와<sup>12)</sup> 학교 급식소 조리실 낙하세균을 측정된 결과 1.35~1.42 log CFU/plate를 나타내었다는 보고와<sup>21)</sup> 비교 시 다소 높은 결과이다. 이러한 결과는 학교 환경에서 공기 중 세균의 농도는 학생 수와 함께 학생의 활동성에 연관된다는 보고와<sup>14)</sup> 계절별로 동절기에 비해 하절기에 일반세균 오염이 증가하였다 보고로<sup>12)</sup> 보아 본 실험이 어린이집 영유아들이 오전 활동을 마치고 급식을 제공 받는 12시경에 실시되었고 계절별로는 7월 하절기에 실시되었기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 아직 면역력이 체계적으로 발달하지 못한 환경보건학적 약자인 영유아를 보육대상으로 하는 어린이집 급식실에서 주방이나 조리실 보다 세균오염도가 높게 나타났다는 것은 영유아들의 건강상 위해요소로 작용할 수 있어 각별한 주의가 필요하며 주기적인 환기 등의 실내공기 질 관리가 필요한 것으로 판단된다. 실내공기 중 대장균군을 실험한 보고가 전무하여 다른 시설과 비교할 수는 없었으나 평균 0.47±0.62 log CFU/plate를 나타내어 일반세균에 비해 낮은 오염도를 나타내었으며 전체 어린이집 64개소 중 42개소에서 분리되어 실험대상 급식실 중 60.9%의 실내공기에서 대장균군이 검출되었다. 대장균군은 식품의 위생상태와 청결상태를 나타내는 위생 지표세균으로 대장균군이 검출될 경우 식중독 세균 등 병원성 미생물이 검출될 확률이 높아 어린이집 급식실 실내공기의 관리가 필요한 것으로 판단되었다.<sup>1)</sup>

급식실 실내공기 중 진균이 평균 0.59±0.71 log CFU/plate를 나타낸 것은 동일 방법과 노출시간에서 휴게음식점 주방에서 0.23~0.80 log CFU/plate를 나타내었다는 보고와<sup>12)</sup> 유사한 결과이나 진균의 경우 실내공기 중 미세먼지나 수증기와 결합하여 bioaerosol 형태로 흡입되어 질병을 발생시키고 진균의 대사산물이 여러 질병의 원인물질로 작용한다는 보고와<sup>13)</sup> 면역력이 취약한 영유아를 보육하는 어린이집 급식 환경을 고려할 때 각별한 주의가 필요한 것으로 판단된다. 현재 보육시설 등 국내 다중이용시설의 실내 공기 중 미생물 규정은 총부유세균 800 CFU/m<sup>3</sup>만을 설정하고 있고 총부유진균에 관한 규정은 설정되어 있지 않으나 세계보건기구 (World Health Organization)에서는 총부유진균에 대한 가이드라인을 2.17 log CFU/m<sup>3</sup>으로 제시하고 있고 미국 노동

성 산업안전보건청 (U.S. Occupational Safety and Health Administration)에서는 3.00 log CFU/m<sup>3</sup>을 기준으로 제한하고 있어 향후 영유아들의 건강관리를 위하여 총부유진균수에 관해서도 규격을 설정하여야 할 것으로 판단된다.<sup>22,23)</sup>

*Staphy. aureus*가 0.28±0.95 log CFU/plate의 오염도를 나타내고 전체 어린이집 64개소 중 4개소 (6.3%)에서 검출된 것은 유치원 실내 환경에서 공기 중 미생물을 조사한 결과 그람 양성 구균 중 *Staphy. aureus*는 검출되지 않고 *Micrococcus spp.*, *Staphy. epidermidis*, *Staphy. cohnii*, *Staphy. lentus* 등이 검출되었다는 보고에<sup>5)</sup> 비해 높은 결과이나 병원 실내공기 중에서 *Staphy. aureus*가 6.6에서 11.3%까지 검출되었다는 보고에<sup>16)</sup> 비해 다소 낮은 결과이다. *B. cereus*가 0.68±1.00 log CFU/plate의 오염도를 나타내고 전체 어린이집 64개소 중 21개소 (32.8%)에서 검출된 것은 병원 실내공기 중에서 *B. cereus*가 1.9에서 8.2%까지 검출되었다는 보고에<sup>16)</sup> 비해 매우 높은 결과로서 어린이집 급식실 실내공기 중 *B. cereus*에 의한 식중독 발생 가능성이 상존하는 것으로 판단되었다. 미래 집단식중독의 주요 원인 미생물로 보고된 *Staphy. aureus*와 *B. cereus*가<sup>24)</sup> 어린이집 급식실 실내공기 중에서 검출된 것은 실외에 비해 실내의 경우 외부 공기의 순환이 제한적이고 햇빛의 의한 살균작용도 미약하며<sup>5)</sup> 그람 양성 포자형성균인 두 균주가 포자를 형성하여<sup>25)</sup> 어린이집 급식실 실내 환경에 오염되어 있었기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 어린이집 급식실 실내공기에 의한 식중독을 예방하기 위하여 주기적인 환기와 실내 환경에 대한 철저한 위생관리가 필요한 것으로 판단된다.

대표적인 독소형 식중독 원인균주인 *Staphy. aureus*의 독소 (Staphylococcal enterotoxin; SE)는 SEA~SEQ 등 총 18종이 보고되고<sup>6)</sup> 있으나 현재까지 상업적 kit를 이용해 검출할 수 있는 *Staphy. aureus* 독소는 SEA~SED 등 총 4 종류로 한정되어 있다. 본 실험에서는 총 18종의 독소 유전자를 대상으로 실험하여 불검출을 확인하였으나 독소 생산 능력 실험의 경우 SEE~SEQ 독소에 대해 실험하지 못했다. 그러나 분리된 *Staphy. aureus* 4균주 모두 독소 유전자를 함유하지 않는 것으로 나타나 보육시설 급식실 실내공기 중 *Staphy. aureus*에 의한 식중독 발생 가능성은 매우 낮은 것으로 판단되었다. *B. cereus*의

경우 *nheABC*, *hblCDA*, *entFM* 독소 유전자가 각각 100, 57.1, 76.2% 검출되고 구토독소를 생산하는 *ces* 유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다. 이러한 결과는 국내 환자 및 식품에서 분리된 *B. cereus*의 독소 유전자 검출율이 각각 *nheABC* (94.2%), *hblCDA* (90.0%), *entFM* (65.8%)로 나타났다는 보고와 유사한 결과이며<sup>26)</sup> *B. cereus* 독소 유전자 중 *nheABC*가 가장 높은 검출율을 나타낸다는 보고와 일치하는 결과이다.<sup>20,27)</sup> *B. cereus*의 대표적인 독소인 HBL과 NHE 중 HBL 독소는 B, L1 및 L2의 구조로 구성되어 있으며 각각의 구조 단백질은 *hblA*, *hblC* 및 *hblD* 유전자로부터 생산되며 3가지 구성요소가 모두 있어야 식중독을 일으킨다고 보고되고 있다.<sup>28,29)</sup> NHE 독소는 NheA, NheB 및 NheC 단백질의 복합 구조로 구성되어 있으며 각각의 단백질은 *nheA*, *nheB* 및 *nheC* 유전자로부터 생산되어 식중독을 발생 시킨다.<sup>30,31)</sup> *nheABC* 독소 유전자는 실험에 사용된 전체 *B. cereus* 균주에서 검출되었으나 NHE 독소는 21균주 중 3균주 (14.3%)에서만 검출되었다. 이러한 결과는 본 실험에 사용된 BDE-VIA kit가 NheA 독소만을 검출하고 NheB, NheC 독소를 검출하지 못하는 한계에 의한 것으로 판단되며 NheB, NheC 독소를 검출하는 kit가 개발되면 더 높은 검출율을 나타낼 것으로 판단된다. 독소 생산 실험 결과, 국내에서 분리된 *B. cereus* 균주 중 61.9%가 한 가지 이상의 독소를 생산하는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 국내에서 분리된 대부분의 *B. cereus* 균주가 HBL, NHE 등 한 가지 이상의 독소를 생산한다는 보고와<sup>27,31)</sup> 일치하는 결과로서 어린이집 급식실 실내공기에 오염된 *B. cereus* 균주의 낙하에 따른 식중독 위험성이 상존하는 것으로 판단되었다.

## V. 결 론

어린이집 급식실 실내공기 중 위생지표 미생물과 식중독 세균 오염도를 측정하고 분리균주의 독소생성 특성을 분석하여 어린이집 영유아들이 안전한 실내 환경에서 급식을 제공 받을 수 있도록 하기 위하여 수도권 소재 국공립 어린이집 15개소과 민간 어린이집 49개소 총 64개소의 어린이집 급식실 실내공기 중 미생물 분포와 분리균주의 독소 특성을 실험하였다. 어린이집 급식실 실내공기 중 일반세균



수는 평균  $1.91 \pm 1.84 \log$  CFU/plate, 대장균수는 평균  $0.47 \pm 0.62 \log$  CFU/plate, 진균수는 평균  $0.59 \pm 0.71 \log$  CFU/plate 등 학교 조리실 보다 높은 미생물 오염도를 나타내 영유아들의 안전한 급식환경을 위하여 주기적인 환기 등의 실내공기 질 관리에 각별한 주의가 필요하며 영유아들의 건강관리를 위하여 총부유진균수에 관한 규격 설정이 필요한 것으로 판단되었다. 식중독 세균인 *Staphy. aureus*는 어린이집 64개소 중 4개소 (6.3%)에서 검출되고 평균  $0.28 \pm 0.95 \log$  CFU/plate의 오염도를 나타내었다. *B. cereus*는 어린이집 64개소 중 21개소 (32.8%)에서 검출되고 평균  $0.68 \pm 1.00 \log$  CFU/plate의 오염도를 나타내어 어린이집 급식실 실내공기 중 *B. cereus*에 의한 식중독 발생 가능성이 *Staphy. aureus* 보다 높은 것으로 판단되었다. 미래 집단식중독의 주요 원인 미생물인 *Staphy. aureus*와 *B. cereus*가 어린이집 급식실 실내공기에 오염되는 것을 예방하기 위하여 주기적인 환기와 실내 환경에 대한 철저한 위생관리가 필요한 것으로 판단된다. 분리 동정된 *Staphy. aureus* 4균주 모두에서 독소 유전자와 독소가 검출되지 않았지만 모든 *B. cereus* 균주에서 *nheABC* 독소 유전자가 검출되었고 4개 그룹의 독소 유전자 Pattern을 나타내었다. *B. cereus* 21균주 중 11균주 (52.4%)에서 HBL 독소가, 3균주 (14.3%)에서 NHE 독소가 검출되어 어린이집 급식실 실내공기에 오염된 *B. cereus* 균주의 낙하에 따른 식중독 위험성이 상존하는 것으로 판단되었다.

### 참고문헌

- Kim JB, Park YB, Kim KC, Kim DH, Kang SH, Lim YS et al. Evaluation and reduction of microbiological hazards of spoon and spoon case carried by nursery school children. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011; 40(1): 116-122.
- Lee YM. The different view point of child education center food service program between the parents and the teachers. *Kor J Comm Nutr.* 2005; 10(5): 654-667.
- Central Childcare Information Center. Statistics on Child Care Service. 2012 May 16. Available at: <http://central.childcare.go.kr>.
- Jang ML, Kim YB. A study of the actual conditions of kindergarten meals program. *J Kor Soc Early Childhood Education.* 2003; 23(3): 261-284.
- Hwang KH, Lee AM, Shin HJ, Kim JS. Seasonal monitoring of microbial concentrations in kindergartens. *Kor J Microb.* 2003; 39(4): 253-259.
- Kim JB, Hur ES, Kang SH, Kim DH, Do YS, Park PH et al. Prevalence of microbiological hazard on nursery school children's hands and effect of hand washing education. *J Fd Hyg safety.* 2012; 27(1): 30-36.
- Min JH, Lee YK. Microbiological quality evaluation for implementation of HACCP system in day-care center foodservice operation. I. Focus on heating process and after-heating process. *Kor J Nutr.* 2004; 37(8): 712-721.
- Min JH, Lee YK. Microbiological quality evaluation for implementation of HACCP system in day-care center foodservice operation. II. Focus on non-heating process. *Kor J Nutr.* 2004; 37(8): 722-731.
- Korea Food and Drug Administration. Information of Food Poison. 2012 May 16. Available at: <http://e-stat.kfda.go.kr>.
- Zhao P, Zhao T, Dolye MP, Rubino JR, Meng J. Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *J Food Prot.* 1998; 61(8): 960-963.
- Kim JH, Kim YS, Han JS. Disinfection state and effective factors of facilities and utilities of elementary school in Busan-based in the characteristics of dietitian, employee and foodservice. *J Kor Diet Assoc.* 2004; 10(1): 34-46.
- Kim JG, Park JY, Kim JS. A study on the sanitary condition of kitchens in food court/cafeterias - An observation on seasonal variations. *J Environ Health Sci.* 2012; 38(2): 118-127.
- Kim NY, Kim YR, Kim MK, Cho DW, Kim JS. Isolation and characterization of airborne bacteria and fungi in indoor environment of elementary school. *Kor J Microb.* 2007; 43(3): 193-200.
- Lee AM, Kim NY, Kim SY, Kim JS. Distribution and characteristics of airborne microorganisms in indoor environment of schools. *Kor J Microb.* 2005; 41(3): 188-194.
- Won DH, Huh EH, Jeong HC, Moon KW. Microbiological contamination in office building by work space structure. *J Env Heal Sci.* 2012; 38(3): 213-222.
- Chang MW, Chang TH, Park ID, Kim KH. Antibiotic susceptibility to isolated bacteria and fungi from the indoor-air. *Kor J life Sci.* 1998; 8(5): 537-549.
- Kim SH, Kim YK. A study on microbial pollution

- of indoor air at elderly care facilities. *J Kor Acad-Indus Cooper Soc.* 2009; 10(9): 2485-2491.
18. Korea Food and Drug Administration. Food Code of Korea. Seoul Korea: KFDA, 2005.
  19. Choi HY, Park SG, Kihl CN. Laboratory methods for environmental health. Seoul Korea: Shinkwang Publishing Co. 1993.
  20. Kim JB, Kim JM, Kim CH, Seo KS, Park YB, Choi NJ et al. Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2010; 144(1): 182-186.
  21. Kim JG, A survey on the sanitation condition of kitchens and facilities of a school food-service program. *Kor J Environ Health.* 2003; 29(1): 87-93.
  22. World Health Organization (WHO). Indoor air quality: biological contaminants. report on a WHO meeting, WHO regional Publications European series No. 31. WHO, Copenhagen. Denmark. 1988.
  23. US OSHA (United States Occupational Safety and Health Administration), Sampling Instrumentation and Methods, OSHA Technical Manual. OSHA, Washington, DC. 1992.
  24. Jo SH, Kim CI, Ha SD. Outbreak pattern forecasting of food-borne disease in group food services in Korea. *J Fd Hyg Safety.* 2009; 24(1): 19-26.
  25. Kim JB, Kim JM, Kim SY, Kim JH, Park YB, Choi NJ et al. Comparison of enterotoxin production and phenotypic characteristics between emetic and enterotoxic *Bacillus cereus*. *J Food Prot.* 2010; 73(7): 1219-1224.
  26. Granum PE, O'Sullivan K, Lund T. The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 177(2): 225-229.
  27. Kim JB, Kim JM, Cho SH, Oh HS, Choi NJ, Oh DH. Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples. *J Food Sci.* 2011; 76(1): T25-29.
  28. Beecher DJ, Schoeni JL, Wong ACL. Enterotoxic activity of haemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun.* 1995; 63(11): 4423-4428
  29. Schoeni JL, Wong ACL. Heterogeneity observed in the components of haemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol.* 1999; 53(2-3): 159-167.
  30. Kim JB, Jeong HR, Park YB, Kim JM, Oh DH. Food poisoning associated with emetic-type of *Bacillus cereus* in Korea. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(5): 555-563.
  31. Kim JB, Park JS, Kim MS, Hong SC, Park JH, Oh DH. Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. *Int J Food Microbiol.* 2011; 150(1): 66-72.