

보육시설 유아 사용 수건의 미생물 분포 및 독소 특성

김중범* · 김난영 · 강석호 · 도영숙 · 엄미나 · 윤미혜 · 이정복

경기도보건환경연구원 보건연구부

Prevalence and Toxin Characteristics of Microorganism on Hand Towels Using for Children in Child Care Center

Jung-Beom Kim*, Nan-Yong Kim, Suk-Ho Kang, Young-Sook Do, Mi-Na Eom, Mi-Hye Yoon, and Jong-Bok Lee

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

(Received November 6, 2012/Revised March 3, 2013/Accepted April 19, 2013)

ABSTRACT - This study was conducted to evaluate the microbiological contamination on commonly used hand towels in the child care centers and to investigate the toxin gene and toxin production ability of food-borne pathogens. A total of 22 commonly used hand towels including 7 for before use and 15 for during use were tested. The average number of total aerobic bacteria and fungi were 6.2 log CFU/100 cm² and 4.1 log CFU/100 cm². Coliform bacteria were detected in 4 out of 7 before used towels (57.1%) and all of during used towels (100%). These results showed that the sanitary conditions of hand towels in the child care centers should be improved promptly. Among the pathogenic bacteria, *Staph. aureus* and *B. cereus* without *Salmonella* spp. were detected in 5 (22.7%) and 11 (50.0%) out of 22 hand towels. All of *Staphy. aureus* isolated in this study did not possess any toxin genes and did not produce enterotoxin. The detection rate of *hblC*, *hblD*, and *hblA* toxin genes in *B. cereus* was 72.7, 72.7, and 54.5% respectively. The possession rate of *nheA*, *nheB*, and *nheC* toxin genes showed 81.8, 72.7, and 54.5% respectively. The *cytK* and *entFM* toxin genes were presented at 45.5 and 90.0% in *B. cereus*. The HBL was detected in 8 out of 11 *B. cereus* isolates (72.7%) and 5 *B. cereus* isolates produced NHE (45.5%). Ten out of eleven *B. cereus* isolates (90.9%) produced one or more enterotoxin such as HBL and NHE. From the results, using a private hand towel or paper towel is required to prevent the cross-contamination between commonly used hand towel and children's hands in the child care center.

Key words: Child care center, Microbiological contamination, Hand towel

서 론

식품 안전에 대한 사회적 인식이 강화되고 있음에도 불구하고 우리나라의 집단식중독 발생은 지속적으로 증가하고 있으며 식품의약품안전청의 식중독발생 보고를 분석해 보면 2011년 발생건수와 환자수는 249건 7,105명으로 2002년 77건, 2,939명에 비해 발생건수는 3.2배, 환자수는 2.4배 증가하였다¹⁾. 2011년 식중독 발생을 원인시설별로 분석해 보면 음식점 47.0%, 집단급식소 16.1%, 가정집 3.2%로 음식점이 가장 중요한 식중독 발생장소로 판단할 수 있으나 발생 환자수를 기준으로 분석해 보면 집단급식소 35.5%,

음식점 24.7%, 가정집 0.7%로 단체급식을 제공하는 집단급식소가 식중독 발생에 가장 취약한 것으로 보고되고 있다¹⁾. 집단급식소의 식중독 발생 원인은 조리기구, 스펀지, 행주 등에 의한 교차오염과²⁾ 식재료의 안전성 확보 미흡과 시설 설비의 부족³⁾, 손 위생관리 부적절 등 불결한 개인위생 관리가 주요 원인으로 보고되고 있어⁴⁾ 손 씻기 등 개인위생 관리에 대한 지속적인 교육이 필요하다고 보고되고 있다⁵⁾.

우리나라는 자녀 양육과 교육에 대한 부담으로 저출산 현상이 고착화되며 세계적으로 가장 낮은 출산율을 나타내고 있어 자녀 양육과 보육을 가정과 사회가 함께 책임져야한다는 인식이 확산되고 있으며 국가에서도 새로마지플랜 2015 등 저출산 고령화 기본계획을 수립 영유아 보육 및 출산장려 정책을 실시하고 있다^{6,7)}. 이러한 국가적 노력으로 보육시설은 2002년 22,147개소에서 2011년 39,842개소로 1.8배, 보육 영유아수는 800,991명에서 1,348,729명으로 1.7배 증가하였고⁸⁾ 어린이집 등 보육시설에서는 야

*Correspondence to: Jung-Beom Kim, Health Research Department, Gyeonggi-do Institute of Health & Environment
- 95, Pajang cheon-ro, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 440-290, Korea
Tel: 82-31-250-2582, Fax: 82-31-250-2617
E-mail: okjbhy@gg.go.kr

간 돌봄 교실 등 종일제 학급과 단체급식을 제공하고 있어 보육시설이 주요한 단체급식소로 대두되고 있다⁹⁾.

단체급식을 제공하는 보육시설은 면역력이 취약한 유아를 대상으로 하기 때문에 식중독 예방을 위해 어린이들의 개인위생 관리에 각별한 주의가 필요하며^{10,11)} 급격한 인지 발달과 평생 동안의 습관이 형성되는 유아기 특성¹²⁾ 손 씻기 등 개인위생관리가 식중독 예방의 중요한 요소라는 보고를¹³⁾ 고려하여 보육시설에서는 유아들에게 지속적인 손 씻기 교육을 실시하고 있다. 손 씻은 후 손의 건조 방법에는 열풍을 이용한 비접촉 건조와 종이 타올과 수건을 이용한 접촉 건조방법이 있으나¹⁴⁾ 범국민손씻기운동본부에서는 종이 타올을 이용 건조하도록 제시하고 있다¹⁵⁾. 그러나 대부분의 보육시설에서는 설치 및 운영의 곤란함으로 열풍 건조기나 종이 타올보다는 공용 수건을 이용 어린이들의 손을 건조하고 있다. 따라서 어린이집 유아들이 손 씻은 후 사용하는 공용 수건에 대한 위생관리가 불충분하면 미생물에 오염된 수건을 통한 교차오염으로 보육시설 내 집단식중독 발생 가능성이 상존한다 하겠다. 그러나 현재까지의 연구 동향을 살펴보면 학생 손 위생에 대한 미생물학적 위해 평가¹⁶⁾, 조리종사자의 손 위생에 관한 연구¹⁷⁾, 살균소독제를 이용한 조리기구 등에 대한 소독 효과 연구¹⁸⁾ 등 초등학교 이상의 손과 조리기구의 미생물학적 위해분석에 국한되어 있다. 보육시설의 미생물학적 평가는 보육시설과 유치원 급식의 미생물 오염도 평가와¹⁹⁾, 광주지역 유치원생과²⁰⁾ 어린이집 유아 손을 대상으로 한 연구가²¹⁾ 보고되었을 뿐 어린이집 유아들이 손 씻은 후 사용하는 공용 수건에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 어린이집 유아들이 공용으로 사용하는 수건의 미생물 오염도와 분리된 식중독 미생물의 장독소 유전자 및 장독소 생산 특성을 분석하여 어린이집 유아 사용 수건의 위생 안전성을 확보할 수 있는 방안을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

연구대상 및 시료채취

경기도 소재 어린이집 9곳의 어린이가 손 씻은 후 공용으로 사용하는 수건 22개 (사용 전 7개, 사용 중 15개)를 연구대상으로 하였다. 미생물 오염도 실험을 위하여 각각 수건을 멸균백에 담아 냉장상태를 유지하여 실험실로 운반하였으며 어린이가 손을 가장 많이 닦는 수건의 양쪽 끝부분을 가로, 세로 각각 10 cm씩 무균적으로 채취하여 saline 100 mL를 넣어 균질화한 후 시험용액으로 사용하였다.

일반세균수, 대장균군수 및 진균수 측정

일반세균수, 대장균군수 및 진균수는 식품공전에²²⁾ 따라 측정하였으며 10 단계 희석법에 따라 희석한 각각의 희석

액과 시험용액을 멸균 Petri dish 2매에 각각 1 mL씩 분주한 후 일반세균수는 Standard Plate Count agar (Oxoid, England), 대장균군수는 Desoxycholate Lactose agar (Oxoid, England)를 무균적으로 분주하여 냉각 응고시킨 후 35°C에서 24시간 또는 48시간 배양하였다. 진균수는 Potato Dextrose agar (PDA; Difco, USA)를 이용 일반세균수와 동일하게 실험하였으며 25°C에서 5일간 배양하였다²¹⁾. 집락수는 평판 당 30~300개의 집락을 형성하는 평판을 선택하여 계수하였다.

식중독 미생물 분리 동정

식중독 미생물은 식품공전에²²⁾ 따라 실험하였으며 *Salmonella* spp.는 peptone water (Oxoid, England) 9 mL에 시험용액 1 mL를 가하여 35°C에서 24시간 1차 증균 배양한 후 배양액 0.1 mL를 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis broth (Oxoid, England)에 접종하여 42°C에서 24시간 2차 증균 배양하였다. 배양액 1 백금이를 MacConkey agar (Oxoid, England)에 희석 도말하여 35°C에서 24시간 배양한 결과 흰색 집락을 선별하여 Kligler iron agar (KIA; Oxoid, England)와 Tryptic Soy agar (TSA; Oxoid, England)에 도말하여 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양결과 K/A, gas 양성 및 H₂S를 생산한 집락에 대하여 O 혼합혈청 응집실험을 실시하여 혈청응집 양성반응을 나타낸 집락에 대하여 생화학시험을 (API 20E test kit; bioMerieux, France) 실시하였다. 생화학시험 결과는 API web (API 20E version 4.1)을 이용하여 *Salmonella* spp.를 동정하였다⁶⁾.

*Staphylococcus aureus*는 10% NaCl이 첨가된 9 mL Tryptic Soy broth (TSB; Oxoid, England)에 시험용액 1 mL를 가하여 35°C에서 24시간 증균 배양한 후, 난황이 첨가된 Baird-Parker agar (BAP; Oxoid, England)에 희석 도말하여 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양결과 BAP 배지에 혼탁한 백색환을 나타내는 검은색 집락을 선별하여 TSA (Oxoid, England)와 Blood agar (BA; Komed, Korea)에 도말하여 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양결과 BA 배지에서 β-hemolysis를 나타내는 균주에 대하여 coagulase test (Staphylase, Oxoid, England)를 실시하여 coagulase 양성반응을 나타낸 집락에 대하여 생화학시험을 (API Staph test kit; bioMerieux, France) 실시하였다. 생화학시험 결과는 API web (API Staph version 4.1)을 이용하여 *Staph. aureus*를 동정하였다²¹⁾.

*Bacillus cereus*는 시험용액 100 μL를 *Bacillus cereus* Rapid agar (BACARA; AES Chemunex, France)에 도말하여 35°C에서 18시간 배양한 후 분홍색의 혼탁한 환을 갖는 집락을 선별하여 BA (Komed, Korea) 배지에 도말하여 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양결과 β-hemolysis를 나타내는 균주에 대하여 Gram stain, catalase test를 실시한 후 생화학시험을 (API 50CHB and API 20E test kit; bio-

Merieux, France) 실시하였다. 생화학시험 결과는 API web (API 50CHB version 4.0)을 이용하여 *B. cereus*를 동정하였다⁶⁾.

독소 유전자 확인실험

분리 동정된 *Staph. aureus*와 *B. cereus* 미생물의 식중독 유발 가능성을 분석하고자 분리 동정된 균주를 TSA (Oxoid, England)에 도말하여 35°C에서 24시간 배양한 후 TSB (Oxoid, England)에 접종하여 35°C에서 15시간 배양하였다. 배양액을 균질화한 후 1 mL를 취하여 13,000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 멸균증류수 1 mL를 가하여 cell pellet을 부유 시켰다. 동일한 조건에서 2회 반복 원심분리한 후 멸균증류수 500 µL를 가하여 cell pellet을 재부유 시켜 100°C에서 10분간 열처리하고 13,000 × g에서 10분간 원심분리 하였다²³⁾. 상층액 100 µL를 취하여 Spectrophotometer (BioPhotometer; Eppendorf, Germany)를 이용 260 nm에서 DNA 농도를 측정하였고 DNA 농도가 1 µg/mL가 되도록 각각의 튜브를 멸균증류수로 희석하여 실험에 사용하였다²⁴⁾. 대조균주로는 *Staph. aureus* ATCC 25922 및 *B. cereus* 14579와 F4810/72를 사용하였다. *Staph. aureus* 장독소 유전자는 PowerChek™ *S. aureus* toxin ID PCR Kit (Kogenbiotech, Korea)를 이용 확인하였으며 Polymerase Chain Reaction (PCR) 조건은 initial denaturation 94°C, 120 seconds 후 denaturation 94°C, 60 seconds, annealing 54°C, 60 seconds, extension 72°C, 120 seconds 의 35 cycle을 반복한 후 final extension 72°C, 300 seconds

로 제조사의 방법에 따라 실험하였다. *B. cereus* 장독소 유전자 확인 실험에 사용된 primer sequences와 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다^{23,24)}. PCR 튜브 조성은 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP, 10 pM primer, 2 U Taq polymerase (Bioneer, Korea)와 2 µL template DNA가 되도록 하였다. PCR 반응은 Eppendorf thermal cycler (Mastercycler Gradient S; Eppendorf, Germany)를 이용하였으며 전기영동은 PCR product를 2% agarose gel에 loading 한 후 110 V에서 40분간 실시하였다. 장독소 유전자 확인은 agarose gel을 0.5 µg/mL ethidium bromide solution에 5분간 침지하여 염색한 후 UV transilluminator (Gel Doc 2000; Bio-Rad, USA)를 이용 각각의 밴드를 확인하였다²⁴⁾.

장독소 생산능 확인실험

분리 동정된 *Staph. aureus*와 *B. cereus* 미생물의 식중독 유발 가능성을 분석하고자 분리균주를 TSB (Oxoid, England)에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 3000 × g에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 장독소 생성능 확인실험에 사용하였다. *Staph. aureus*의 장독소 생성능은 *Staphylococcus aureus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit (SET-RPLA; Denka Seiken, Japan)를 이용하였으며, *B. cereus*의 장독소 중 heamolysin BL enterotoxin (HBL) 생성능은 *B. cereus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit (BCET-RPLA; Oxoid, England)를 사용하였고, non-heamolysin enterotoxin (NHE)은 *Bacillus diarrheal* enterotoxin visual immunoassay kit (BDE-VIA; Tecra in-

Table 1. Sequences of primers and PCR reaction conditions for the detection of *Bacillus cereus* toxin genes

Amplification target	Sequence (5'-3')	Reaction condition	Amplicon size (bp)
<i>nheA</i>	GTTAGGATCACAATCACCGC ACGAATGTAATTTGAGTCGC	94°C, 2 min → (94°C, 60 sec → 56°C, 60 sec → 72°C, 120 sec) 35 cycle → 72°C, 5 min	755
<i>nheB</i>	TTTAGTAGTGGATCTGTACGC TTAATGTTCTGTTAATCCTGC	94°C, 2 min → (94°C, 60 sec → 54°C, 60 sec → 72°C, 120 sec) 35 cycle → 72°C, 5 min	743
<i>nheC</i>	TGGATTCCAAGATGFAACG ATTACGACTTCTGCTTGTGC	94°C, 2 min → (94°C, 60 sec → 54°C, 60 sec → 72°C, 120 sec) 35 cycle → 72°C, 5 min	683
<i>hblC</i>	GATACTCAATGTGGCAACTGC TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG	94°C, 2 min → (94°C, 60 sec → 58°C, 60 sec → 72°C, 120 sec) 35 cycle → 72°C, 5 min	740
<i>hblD</i>	ACCGGTAACACTATTTCATGC GAGTCCATATGCTTAGATGC	94°C, 2 min → (94°C, 60 sec → 58°C, 60 sec → 72°C, 120 sec) 35 cycle → 72°C, 5 min	829
<i>hblA</i>	AAGCAATGGAATACAATGGG AGAATCTAAATCATGCCACTGC	94°C, 2 min → (94°C, 60 sec → 56°C, 60 sec → 72°C, 120 sec) 35 cycle → 72°C, 5 min	1,154
<i>entFM</i>	AAAGAAATTAATGGACAAACTCAAACCTCA GTATGTAGCTGGGCTGTACGT	95°C, 3 min → (95°C, 30 sec → 60°C, 30 sec → 72°C, 60 sec) 35 cycle → 72°C, 5 min	596
<i>cytK</i>	GTAACCTTCATTGATGATCC GAATACTAAATAATTGGITTC	95°C, 1 min → (95°C, 60 sec → 48°C, 60 sec → 72°C, 60 sec) 30 cycle → 72°C, 7 min	505
<i>ces</i>	GGTGACACATTATCATATAAGGTG GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	95°C, 15min → (95°C, 60sec → 58°C, 75sec → 72°C, 50sec) 25 cycle → 72°C, 5min	1,271

ternational Pty Ltd., Australia)를 사용하였다. 각각의 장독소 생산능은 제조사가 권장하는 실험방법과 Kim 등의 실험방법에 따라 실험하였다⁶⁾.

결과 및 고찰

어린이집 유아 사용 수건의 미생물 오염도

어린이집 유아들이 손 씻은 후 공용으로 사용하는 수건의 미생물 오염도를 분석하고자 일반세균수, 대장균군수 및 진균수를 실험하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 일반세균수는 1.6~7.0 CFU/100 cm²의 범위에 평균 6.2 log CFU/100 cm²로 검출되었고 사용 전 수건은 평균 5.4 log CFU/100 cm², 사용 중인 수건은 평균 6.3 log CFU/100 cm² 검출되어 사용 중인 수건의 오염도가 다소 높게 나타났다. 진균수는 불검출에서 5.2 CFU/100 cm²의 범위에 평균 4.1 log CFU/100 cm²로 검출되었고 사용 전 수건은 평균 2.5 log CFU/100 cm², 사용 중인 수건은 평균 4.3 log CFU/100 cm² 검출되어 사용 중인 수건의 진균 오염도가 높게 나타났다. 위생지표미생물인 대장균군은 사용 전 수건의 경우 7건 중 4건 (57.1%)에서만 검출되었으나 사용 중인 수건 15건 모두에서 검출되어 (100%) 사용 중인 수건의 대장균군 오염도가 사용 전 수건에 비해 높게 나타났다.

어린이집 유아 사용 수건의 일반세균수 오염도가 평균 6.2 log CFU/100 cm²로 나타난 것은 어린이 손의 일반세균 오염도가 평균 3.7 log CFU/hand로 나타났다는 보고와²¹⁾ 조리 종사자 손과 대학생 손의 일반세균 오염도가 평균 3.3 및 3.1 log CFU/hand로 나타났다는 보고에^{25,26)} 비해 매우 높은 오염도를 나타낸 결과로서 어린이집 유아들이 손 씻은 후 사용하는 수건의 위생 관리가 필요한 것으로 판단되며 사용 전 수건에서도 높은 일반세균수가 검출된 것은 세탁 중 살균과정이 없으며 세탁 후 상대습도가 높은 화장실에 수건을 보관한 것에 기인하는 것으로 판단된다. 식품제조에 사용되는 기구 및 설비 표면에 대한 일반세균수 기준이 100 cm²당 2.7 log CFU 미만은 만족한 수준, 2.7~3.4 log CFU는 시정이 필요한 수준, 3.4 log CFU 이상은 즉각적인 위생조치를 강구하여야 하는 수준이라는 보고와²⁷⁾ 비교 시 사용 전 수건의 경우 7건 중 4건 (57.1%), 사용 중인 수건의 경우 15건 중 14건 (93.3%)이 즉각적인 위생조

치를 강구하여야 하는 수준으로 판단되어 어린이집 유아들이 손 씻은 후 사용하는 수건의 세탁 및 보관에 대한 즉각적인 시정조치가 필요한 것으로 판단되었다. 수건에 대한 진균수 보고가 전무하여 직접적인 비교는 곤란하였으나 사용 전 수건 평균 2.5 log CFU/100 cm², 사용 중인 수건 평균 4.3 log CFU/100 cm²로 진균수가 검출된 것은 수저 평균 2.4 log CFU, 수저집 평균 3.8 log CFU의 진균이 검출되었다는 보고와⁶⁾ 수저 및 수저집의 면적이 수건 보다 작은 것을 고려할 때 다소 낮거나 유사한 오염도를 나타낸 것으로 판단할 수 있으나 진균의 경우 대사산물이 여러 질병의 원인물질로 작용한다는 보고와²⁸⁾ 면역력이 취약한 어린이들을 보육하는 환경을 고려할 때 주의가 필요한 것으로 판단된다.

대장균군은 수건의 청결상태를 나타내는 위생 지표세균으로 사용 전 수건의 57.1%, 사용 중인 수건의 100%에서 대장균군이 검출된 것은 어린이집 유아 손의 대장균군 검출율이 14.3%이고²¹⁾ 광주지역 유치원생의 손은 1.8%, 초등학교 학생은 4.5%에서 대장균군이 검출되었다는 보고와²⁰⁾ 비교할 때 매우 높은 오염도를 나타내었다. 식품제조에 사용되는 기구 및 설비 표면에 대한 대장균군수 기준이 100 cm²당 1.0 log CFU 미만이어야 하고 검출되지 않아야 양호한 수준이라고 보고와²⁷⁾ 비교 시 사용 전 수건의 경우 7건 중 4건 (57.1%), 사용 중인 수건의 경우 15건 모두가 (100%) 즉각적인 위생조치를 강구하여야 하는 수준으로 판단되었다. 이러한 결과는 어린이집 유아들이 손 씻은 후 사용하는 수건에서 식중독 미생물 등 병원성 미생물이 검출될 확률이 높고 수건을 통한 교차오염으로 어린이 손에 병원성 미생물 등이 재오염될 가능성이 상존하므로 이를 방지하기 위해 어린이가 손 씻은 후 사용하는 수건의 위생적인 살균 세탁 및 상대습도가 낮은 곳에 보관하는 등의 사용 전 수건 보관 방법 개선이 필요한 것으로 판단되었다.

어린이집 유아 사용 수건의 식중독 미생물 오염도

어린이집 유아들이 손 씻은 후 공용으로 사용하는 수건의 식중독 미생물 오염도를 평가하고자 *Salmonella* spp., *Staph. aureus*, *B. cereus*를 실험하였으며, 그 결과는 Fig. 1에 나타내었다. *Salmonella* spp.의 경우 실험에 사용된 모든 수건에서 검출되지 않았으나, *Staph. aureus*는 22건 중

Table 2. Microbiological evaluation of commonly used hand towels in child care center

Towel	Total aerobic bacteria		Coliform bacteria		Fungi	
	Mean ¹⁾	Range	Mean	Range	Mean	Range
Before use (n = 7)	5.4	1.6~5.9	1.9	ND ²⁾ ~2.6	2.5	ND~3.2
During use (n = 15)	6.3	3.1~7.0	2.6	1.0~3.4	4.3	1.0~5.2
Total (n = 22)	6.2	1.6~7.0	2.5	ND~3.4	4.1	ND~5.2

¹⁾Unit: log CFU/100 cm² towel.

²⁾ND: Not detected (detection limit: < 1.0 log CFU/100 cm² towel).

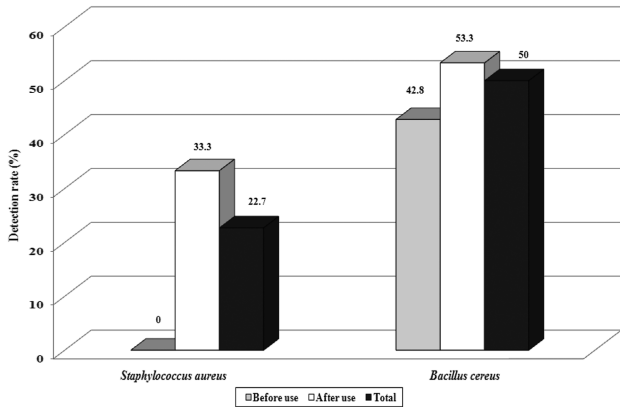


Fig. 1. Detection rate(%) of food-borne pathogens isolated from commonly used hand towels in child care center.

5건 (22.7%), *B. cereus*는 11건 (50.0%)에서 검출되어 *B. cereus*가 *Staph. aureus* 보다 높은 검출율을 나타내었다. 사용 전후에 따른 식중독세균 검출율을 살펴보면 *Staph. aureus*의 경우 사용 전 수건에서는 검출되지 않았으나 사용 중인 수건 15건 중 5건 (33.3%)에서 검출되었고 *B. cereus*의 경우 사용 전 수건 7건 중 3건 (42.8%), 사용 중인 수건 15건 중 8건 (53.3%)에서 검출되어 사용 중인 수건의 *B. cereus* 오염이 가장 심각한 것으로 나타났다.

*Staph. aureus*가 22건 중 5건 (22.7%), *B. cereus*는 22건 중 11건 (50.0%)의 수건에서 검출된 것은 경기도 지역 어린이집 유아 손의 식중독 미생물 오염도 조사결과 *Staph. aureus*는 35명 중 9명 (25.7%), *B. cereus*는 35명 중 16명 (45.7%)에서 검출되었다는 보고와²¹⁾ 서울지역 초등학교 학생 손의 *Staph. aureus* 오염도를 조사한 결과 남학생의 경우 29.4%, 여학생의 경우 24.1%의 검출율을 나타내었다는 보고와¹⁶⁾ 유사한 결과이나 광주지역 유치원생 손의 *Staph.*

aureus 오염도가 11.7%, *B. cereus* 오염도가 7.2%이었다는 보고에²⁰⁾ 비해 매우 높은 오염도를 나타낸 결과로서 어린이집 유아 사용 수건의 식중독 미생물을 저감화하기 위해 철저한 위생관리가 필요한 것으로 판단되었다. *Staph. aureus*가 사용 전 수건에서는 검출되지 않고 사용 중인 수건에서만 검출된 것은 건강한 사람의 손 등의 신체부위에도 *Staph. aureus*가 오염되어 있다는 보고를²⁹⁾ 참조할 때 어린이 손에 오염되어 있던 *Staph. aureus*가 손 씻기를 통해 완벽하게 제거되지 않고 수건에 오염될 개연성이 상존하여 손과 수건간의 교차오염을 방지하기 위한 올바른 손 씻기 교육과²⁷⁾ 개인별 수건 또는 종이 타올 사용을 고려하여야 할 것으로 판단되었다. 또한, *B. cereus*의 경우 사용 전 수건에서도 검출되어 어린이 사용 수건의 위생적인 살균 세탁 및 상대습도가 낮은 곳에 보관하는 등의 보관 방법 개선이 필요한 것으로 판단되었다.

식중독 미생물의 장독소 유전자 분포 및 생산능

분리 동정된 *Staph. aureus*와 *B. cereus* 식중독 미생물의 식중독 유발 가능성을 분석하고자 장독소 유전자와 장독소 생산능 실험을 실시하였으며 *B. cereus*의 장독소 유전자 분포는 Table 3에 나타내었고 *Staph. aureus*의 장독소 생산능은 Table 4에, *B. cereus*의 장독소 생산능은 Table 5에 나타내었다. 사용 중인 수건에서 분리된 *Staph. aureus* 5균주의 장독소 유전자 실험결과 *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq* 등 총 16종의 독소 유전자가 모두 불검출 되었으나 *B. cereus*의 경우 HBL 장독소를 생산하는 *hblC, hblD, hblA* 유전자가 11균주 중 각각 8균주 (72.7%), 8균주 (72.7%), 6균주 (54.5%)에서 검출되었고 NHE 장독소를 생산하는 *nheA, nheB, nheC* 유전자가 11균주 중 각각 9균주 (81.8%), 8균주

Table 3. Different toxin genes patterns of *Bacillus cereus* isolated from commonly used hand towels in child care center

Isolates	Toxin gene								
	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>entFM</i>	<i>ces</i>
Towel-1	+ ¹⁾	+	+	+	- ²⁾	+	-	+	-
Towel-2	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Towel-3	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Towel-5	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Towel-17	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Towel-20	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Towel-21	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Towel-42	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Towel-43	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Towel-44	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Towel-64	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Detection rate (%)	72.7	72.7	54.5	81.8	72.7	54.5	45.5	90.0	0.0

¹⁾+: Detected.
²⁾-: Not detected.

Table 4. Toxin production of *Staphylococcus aureus* isolated from commonly used hand towels in child care center

Isolates	Enterotoxin ¹⁾			
	A	B	C	D
Towel-15	- ²⁾	-	-	-
Towel-43	-	-	-	-
Towel-77	-	-	-	-
Towel-93	-	-	-	-
Towel-143	-	-	-	-

¹⁾*Staphylococcus aureus* enterotoxin was detected using *Staphylococcus aureus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit.

²⁾ -: Not detected.

Table 5. Toxin production of *Bacillus cereus* isolated from commonly used hand towels in child care center

Isolates	Enterotoxin	
	HBL ¹⁾	NHE ²⁾
Towel-1	+ ³⁾	- ⁴⁾
Towel-2	+	+
Towel-3	+	+
Towel-5	+	-
Towel-17	+	-
Towel-20	+	-
Towel-21	+	+
Towel-42	-	+
Towel-43	+	-
Towel-44	-	-
Towel-64	-	+

¹⁾*Bacillus cereus* hemolysin BL enterotoxin (HBL) was detected using *Bacillus cereus* enterotoxin reversed passive latex agglutination (BCET-RPLA) kit.

²⁾*Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (NHE) was detected using *Bacillus diarrheal* enterotoxin visual immunoassay (BDE-VIA) kit.

³⁾+: Detected.

⁴⁾ -: Not detected.

(72.7%), 6균주 (54.5%)에서 검출되어 *nheA* 독소 유전자가 높은 검출율을 나타내었다. *cytK* 장독소 유전자는 11균주 중 5균주 (45.5%)에서 검출되어 낮은 검출율을 나타내었으며 *entFM* 장독소 유전자는 11균주 중 10균주 (90.0%)에서 검출되어 가장 높은 검출율을 나타내었다. 구토독소인 Cereulide를 생산하는 *ces* 유전자는 분리된 모든 *B. cereus* 균주에서 불검출 되어 구토형 식중독 발생 위험성은 매우 낮은 것으로 나타났다. 사용 중인 수건에서 분리된 *Staph. aureus* 5균주의 장독소 생산능 실험결과는 장독소 유전자 실험결과와 동일하게 SEA~SED 4 종류의 독소가 모두 검출되지 않았다. *B. cereus* 장독소 실험결과 HBL 독소는 분리된 11균주 중 8균주 (72.7%)에서 검출되었으며, NHE 독소는 11균주 중 5균주 (45.5%)에서 검출되었고 HBL과 NHE 장독소 중 하나 이상을 생산하는 *B.*

cereus 균주는 총 10 균주 (90.9%)로 나타났다. 특히, 분리된 11균주의 *B. cereus* 중 3균주 (27.3%)는 HBL 장독소와 NHE 장독소를 동시에 생산하는 것으로 나타났다.

*Staph. aureus*는 독소형 식중독의 대표적 원인균주로서 *sea-seq* 등 총 16종의 Staphylococcal enterotoxin (SE) 유전자가 보고되고 있으며³⁰⁾ Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) kit를 이용해 검출할 수 있는 *Staph. aureus* 장독소는 SEA~SED 등 총 4 종류로 한정되어 있다. 실험 결과 총 16종의 장독소 유전자와 4종류의 장독소 단백질 모두 검출되지 않아 어린이집 유아들이 손 씻은 후 사용하는 수건에 오염된 *Staph. aureus*에 의한 식중독 발생 가능성은 낮은 것으로 판단할 수 있으나 미래 집단 식중독 발생을 예측한 보고에서³¹⁾ *Staph. aureus*, pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.등을 주요 식중독 원인 미생물이라고 예측하고 있어 손 씻은 후 사용하는 수건에 대한 지속적인 위생관리가 필요한 것으로 판단된다.

*B. cereus*는 감염형과 독소형 식중독을 모두 일으킬 수 있는 원인균주로서 감염성 장독소 유전자는 *hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, *entFM* 등이 있으며 독소형 유전자는 *ces*가 있다³²⁾. *B. cereus*의 장독소 유전자 실험 결과 *hblC*, *hblD*, *hblA* 유전자가 각각 72.7, 72.7, 54.5% 검출되고 *nheA*, *nheB*, *nheC* 유전자가 각각 81.8, 72.7, 54.5%에서 검출되었으며 *cytK*, *entFM* 장독소 유전자는 각각 45.5, 90.0% 검출되었다. 이러한 결과는 국내에서 분리된 *B. cereus*의 *hblCDA*, *nheABC*, *cytK* 장독소 유전자가 각각 90.0, 94.2, 52.5% 검출되었다는 보고에³³⁾ 비해 낮은 검출율을 나타내었으나 *entFM* 장독소 유전자의 경우 65.8%의 검출율을 나타내었다는 보고에³³⁾ 비해 높은 검출율을 나타내어 *Staph. aureus* 보다 *B. cereus*에 의한 식중독 위험성이 높은 것으로 판단되었다. *B. cereus*의 독소는 HBL, NHE, *cytK*, *entFM*, Cereulide 등이 알려져 있으며 HBL 장독소는 *hblA*, *hblC* 및 *hblD* 유전자로부터 생산된 B, L1 및 L2 장독소 단백질의 복합 구조로 구성되어 있으며 3가지 구성요소가 모두 있어야 식중독을 일으킨다고 보고되고³⁴⁾ NHE 장독소는 *nheA*, *nheB* 및 *nheC* 유전자로부터 생산된 NheA, NheB 및 NheC 장독소 단백질이 식중독을 발생 시키는 것으로 보고되고 있다³⁵⁾. *B. cereus* 장독소 실험결과 HBL 장독소는 72.7%, NHE 장독소는 45.5% 검출되었고 HBL과 NHE 장독소 중 하나 이상을 생산하는 *B. cereus* 균주는 90.9%로 나타났다. 이러한 결과는 어린이집 유아 손에서 분리된 *B. cereus* 장독소 실험결과 HBL 장독소는 50.0%, NHE 장독소는 43.8% 검출되었다는 보고와 유사하거나 다소 높은 결과이며²¹⁾ 국내에서 분리된 대부분의 *B. cereus* 균주가 HBL, NHE 등 한 가지 이상의 독소를 생산한다는 보고와³⁶⁾ 일치하는 결과로서 어린이집 유아들이 손 씻은 후 공용으로 사용하는 수건에 오염된 *B. cereus* 균주의 교차오염에 따른 식중독 위험성이 상존하는 것으로 판단되었다.

요 약

어린이집 유아들이 공용으로 사용하는 수건의 미생물 오염도와 분리된 식중독 미생물의 장독소 유전자 및 장독소 생산 특성을 분석하여 어린이집 유아 사용 수건의 위생 안전성을 확보하고자 어린이가 손 씻은 후 공용으로 사용하는 수건 22개 (사용 전 7개, 사용 중 15개)를 연구대상으로 하였다. 일반세균수는 평균 6.2 log CFU/100 cm²로 검출되었고 진균수는 평균 4.1 log CFU/100 cm²로 검출되었으며 대장균군은 사용 전 수건의 경우 7건 중 4건 (57.1%), 사용 중인 수건의 경우 15건 모두에서 (100%) 검출되었다. 어린이 사용 수건의 미생물 오염도가 높게 나타나 수건의 위생적인 살균 세탁 및 상대습도가 낮은 곳에 보관하는 등의 보관 방법 개선이 필요한 것으로 판단되었다. *Salmonella* spp.의 경우 실험에 사용된 모든 수건에서 검출되지 않았으나, *Staph. aureus*는 22건 중 5건 (22.7%), *B. cereus*는 11건 (50.0%)에서 검출되어 *B. cereus* 오염이 가장 심각한 것으로 나타났다. *Staph. aureus* 장독소 유전자와 독소 단백질은 모두 불검출 되었으나 분리 동정된 11균주의 *B. cereus* 장독소 유전자 실험 결과 *hblC*, *hblD*, *hblA* 유전자가 각각 72.7, 72.7, 54.5% 검출되고 *nheA*, *nheB*, *nheC* 유전자가 각각 81.8, 72.7, 54.5% 검출되었으며 *cytK*, *entFM* 장독소 유전자는 각각 45.5, 90.0% 검출되었다. *B. cereus* 장독소 실험결과 HBL 장독소는 11균주 중 8균주 (72.7%), NHE 장독소는 5균주 (45.5%) 검출되었고 HBL과 NHE 장독소 중 하나 이상을 생산하는 *B. cereus* 균주는 10균주 (90.9%)로 나타났다. 수건에 오염된 *B. cereus* 균주의 교차오염에 따른 식중독 위험성이 상존하는 것으로 나타나 개인별 수건 또는 종이 타올 사용을 고려하여야 할 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 연구는 경기도보건환경연구원 연구개발사업으로 수행된 결과로서 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Korea Food and Drug Administration: Information of Food Poison. Available at: <http://www.kfda.go.kr/e-stat>. Retrieved date: 2012 October 17.
2. Zhao, P., Zhao, T., Dolye, M.P., Rubino, J.R. and Meng, J.: Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *J. Food Prot.*, **61**(8), 960-963 (1998).
3. Kim, J.H., Kim, Y.S. and Han, J.S.: Disinfection state and effective factors of facilities and utilities of elementary school in Busan-based in the characteristics of dietitian, employee and foodservice. *J. Korean Diet. Assoc.*, **10**(1), 34-46 (2004).
4. Kang, Y.J.: Handwashing, essential for safe food preparation, a technical review. *J. Korean Public Health Assoc.*, **27**(4), 269-276 (2001).
5. Jeong, J.S., Choi, J.K., Jeong, I.S., Paek, K.R., In, H.K. and Park, K.D.: A nationwide survey on the hand washing behavior and awareness. *J. Prev. Med. Public Health*, **40**(3), 197-204 (2007).
6. Kim, J.B., Park, Y.B., Kim, K.C., Kim, D.H., Kang, S.H., Lim, Y.S., Park, P.H., Yoon, M.H., Lee, J.B.: Evaluation and reduction of microbiological hazards of spoon and spoon case carried by nursery school children. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(1), 116-122 (2011).
7. Lee, Y.M.: The different view point of child education center food service program between the parents and the teachers. *Korean J. Comm. Nutr.*, **10**(5), 654-667 (2005).
8. Central Childcare Information Center: Statistics on Child Care Service. Available at: <http://central.childcare.go.kr>. Retrieved date: 2012 October 17.
9. Jang, M.L. and Kim, Y.B.: A study of the actual conditions of kindergarten meals program. *J. Korean Soc. Early Childhood Education*, **23**(3), 261-284 (2003).
10. Min, J.H. and Lee, Y.K.: Microbiological quality evaluation for implementation of HACCP system in day-care center foodservice operation. I. Focus on heating process and after-heating process. *Korean J. Nutr.*, **37**(8), 712-721 (2004).
11. Min, J.H. and Lee, Y.K.: Microbiological quality evaluation for implementation of HACCP system in day-care center foodservice operation. II. Focus on non-heating process. *Korean J. Nutr.*, **37**(8), 722-731 (2004).
12. Lee, M.H., Kim, H.O., Hyoung, H.K., Kim, H.S.: Knowledge, attitude and behavior related to obesity in elementary school children. *J. Korean Academy Community Nursing*, **18**(3), 469-479 (2007).
13. Kim, J.E., Moon, J.H., Shin, H.A., Lee, J.S., Kwon, S.H., Lee, J.S., Om, A.S.: Microbiological effect of hand safety after hand washing education for preschool children in a day care center. *Korean J. Culinary Research*, **17**(3), 141-150 (2011).
14. Park, J.S., Kim, D.B., Min, H.G.: Comparison of desiccation methods after hand washing for removing bacteria. *J. Korean Biol. Nurs. Sci.*, **13**(1), 8-15 (2011).
15. The National Center of Hand washing Campaign: The correct hand washing. Available at: <http://www.handwashing.or.kr>. Retrieved date: 2012 October 17.
16. Lee, H. and Choi, S.M.: Hand washing awareness among students in Seoul and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated on their hands. *J. Env. Hlth. Sci.*, **35**(4), 278-286 (2009).
17. Park, J.Y., Kim, J.S. and Kim, J.G.: A study on the hand washing awareness and practice of food-service employees and the load of index microorganisms on the hands. *J. Env. Hlth. Sci.*, **36**(2), 95-107 (2010).
18. Kim, Y.J., Choi, K.D., Shin, I.S.: Bactericidal activity of strongly acidic electrolyzed water on various vegetables and kitchen apparatus. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**(5),

- 776-781 (2010).
19. Seol, H.R., Park, H.S., Park, K.H., Park, A.K., Ryu, K.: Microbiological evaluation of food and kitchen environments in childcare center and kindergarten foodservice operations. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**(2), 252-260 (2009).
 20. Chung, J.K., Kim, M.J., Kee, Y.H., Choi, M.H., Seo, J.J., Kim, S.H., Park, J.T., Kim, M.G. and Kim, E.S.: Prevalence of food poisoning bacteria on hands in various age groups. *J. Fd. Hyg. safety*, **23**(1), 40-50 (2008).
 21. Kim, J.B., Hur, E.S., Kang, S.H., Kim, D.H., Do, Y.S., Park, P.H., Park, Y.B., Yoon, M.H., Lee, J.B.: Prevalence of microbiological hazard on nursery school children's hands and effect of hand washing education. *J. Fd. Hyg. safety*, **27**(1), 30-36 (2012).
 22. Korea Food and Drug Administration: Food Code of Korea, Seoul, Korea. pp. 97-117 (2005).
 23. Kim, J.B., Kim, J.M., Park, Y.B., Han, J.A., Lee, S.H., Kwak, H.S., Hwang, I.G., Yoon, M.H., Lee, J.B., Oh, D.H.: Evaluation of Various PCR Assays for Detection of Emetic-Toxin-Producing *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**(7), 1107-1113 (2010).
 24. Kim, J.B., Kim, J.M., Kim, C.H., Seo, K.S., Park, Y.B., Choi, N.J., Oh, D.H.: Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. *Int. J. Food. Microbiol.*, **144**(1), 182-186 (2010).
 25. Kim, J.G., Park, J.Y. and Kim, J.S.: A study on the hand hygiene of food handlers of food court and cafeteria in university campus. *J. Fd. Hyg. safety*, **25**(2), 133-142 (2010).
 26. Park, H.J. and Bae, H.J.: Evaluation of microbiological hazards of hygiene by the customers' hands in university food-service operation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **35**(7), 940-944 (2006).
 27. Doyle, M.P., Ruoff, K.L., Pierson, M., Weinberg, W., Soule, B. and Michaels B.S.: Reducing transmission of infectious agents at home. *Dairy Food Environ. Sanit.*, **20**(5), 330-337 (2000).
 28. Kim, N.Y., Kim, Y.R., Kim, M.K., Cho, D.W., Kim, J.S.: Isolation and characterization of airborne bacteria and fungi in indoor environment of elementary school. *Korean J. Microb.*, **43**(3), 193-200 (2007).
 29. Lee, K.H., Lyu, E.S. and Lee, K.Y.: A study on the sanitary status at various types of restaurants in Changwon city. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**(4), 747-759 (2001).
 30. Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schli, evert. P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. rev.*, **13**(1), 16-34 (2000).
 31. Jo, S.H., Kim, C.I. and Ha, S.D.: Outbreak pattern forecasting of food-borne disease in group food services in Korea. *J. Fd. Hyg. Safety*, **24**(1), 19-26 (2009).
 32. Kim, J.B., Jeong, H.R., Park, Y.B., Kim, J.M., Oh, D.H.: Food poisoning associated with emetic-type of *Bacillus cereus* in Korea. *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**(5), 555-563 (2010).
 33. Kim, J.B., Kim, J.M., Cho, S.H., Oh, H.S., Choi, N.J. and Oh, D.H.: Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples. *J. Food Sci.*, **76**(1), T25-29 (2011).
 34. Schoeni, J.L., Wong, A.C.L.: Heterogeneity observed in the components of haemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, **53**(2-3), 159-167 (1999).
 35. Kim, J.B., Park, J.S., Kim, M.S., Hong, S.C., Park, J.H. and Oh, D.H.: Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **150**(1), 66-72 (2011).
 36. Kim, J.B., Kim, J.M., Kim, S.Y., Kim, J.H., Park, Y.B., Choi, N.J. and Oh, D.H.: Comparison of enterotoxin production and phenotypic characteristics between emetic and enterotoxic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, **73**(7), 1219-1224 (2010).