

유통 중인 즉석·편의식품류에서 분리한 *Bacillus cereus*의 산생 Toxin 및 분자유전학적 특성 조사

김태순* · 김민지 · 강유미 · 오그네 · 최수연 · 오무술 · 양용식 ·
서정미 · 류미금 · 김은선 · 하동룡 · 조배식
광주광역시 보건환경연구원

Molecular Characterization and Toxin Profile of *Bacillus cereus* Strains Isolated from Ready-to-eat Foods

Tae Sun Kim*, Min Ji Km, Yu Mi Kang, Geune Oh, Su Yeon Choi, Mu Sul Oh, Yong Shik Yang,
Jung-Mi Seo, Mi-Geum Ryu, Eun-Sun Kim, Dong-Ryong Ha, and Bae Sik Cho
Health & Environment Institute of Gwangju

Abstract Toxin-producing *Bacillus cereus* is the causative agent of two different types of food poisoning: the emetic and the diarrheal types. This study was conducted to investigate the presence of enterotoxin and emetic toxin genes in 263 *B. cereus* isolated from 619 different ready-to-eat food items. Hemolytic enterotoxins *hblA*, *hblC*, and *hblD* were detected in 85.6, 41.1, and 76.8%, respectively, of the *B. cereus* isolates. About 67.0% (175/263) of the isolates presented all of three genes. Non-hemolytic enterotoxins *nheA*, *nheB*, and *nheC* were detected in 100, 97.0, and 68.4% of the isolates, respectively. Approximately 90.0% (236/263) of the isolates presented all of these three non-hemolytic enterotoxin genes. Emetic toxin gene, *CER*, was detected in 132 of 263 (50.2%) isolates. Computer-assisted cluster analysis of Rep-PCR profiles showed a high genetic diversity among the isolates. All *B. cereus* isolates from food samples tested in this study carried at least 6 of 10 toxin genes.

Keywords: *B. cereus*, enterotoxin, emetic toxin, PCR, genetic diversity

서 론

경제 및 사회발전으로 인하여 소득수준 향상, 사회구조 및 생활 변화, 여성의 사회진출 확대, 독신가구 증가 등은 편의식품에 대한 소비와 외식에 대한 기회를 증가시키고 있다(1). 이러한 즉석 및 편의식품류의 소비증가로 인하여 식품에 대한 위생관리가 소홀할 경우 대형 식중독사고가 발생할 가능성이 높아지고 있다(2). 또한 편의식품 셀러드류는 채소, 과일 등을 주원료로 하여 다양한 형태로 판매되고 있고, 이러한 제품들이 생산, 제조과정 및 유통과정 등 여러 단계들을 거치면서 병원성미생물에 오염될 기회가 증가하여, 최근 식중독 사고 발생건수와 환자수가 급증하고 있다(3). 특히, 즉석섭취 및 신선편의 셀러드 제품은 대부분 별도의 조리과정 없이 제품화하고, 바로 섭취하기 때문에 식품원료에서 유래된 식중독균에 쉽게 노출될 수 있어, 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 과일 및 채소류에서 비롯된 식중독 사례가 증가하고 있는 추세이다(3-5). 국내에서 발생한 식중독 현황을 살펴보면, 전체 발생건수가 2002년에 77건이었으나 2012년은 266건으로 3배 이상 증가하였으며, 특히 외식에 대한 기회가 증가함

에 따라, 셀러드바 및 일반 음식점 등에서의 식중독 발생 비율이 2012년 기준으로 전체의 60% 이상을 차지하고 있다(3). 이와 더불어 매년 세균성 식중독 발생이 대규모로 빈번하게 발생하고 있으며, 그 중 *B. cereus*에 의한 감염이 각종 식품에서 검출되면서 많은 주의가 요구되고 있다(3,5-7).

*B. cereus*는 토양세균의 하나로 토양을 비롯한 먼지, 하수 등 자연계에 널리 분포하여 농작물을 비롯한 대부분의 식품에 쉽게 오염되어 식중독을 유발 시킬 수 있는 독소형 식중독균이다(8). 일반적으로 *B. cereus*로 인한 식중독은 오염된 균수가 5 log CFU/g 이상 되어야 발병하지만, 어린이, 노약자, 면역력이 저하된 고위험군에서는 훨씬 낮은 농도에서도 발병한다고 알려져 있다(9). *B. cereus*는 그람양성균으로 포자를 형성하며 포자는 내열성이 있어 식품에서 포자가 형성되면 가열조리과정에서도 생존하여, 환경의 변화에 따라 포자가 발아되고 균이 성장하며 생성된 독소에 의하여 독소형 식중독이 발생한다. *B. cereus*로 인한 식중독에는 균이 체내에서 성장하는 동안 생성되는 enterotoxin에 의한 설사형(diarrhoeal type) 식중독과 *B. cereus*균이 식품에서 영양 세포 상태로 성장하는 동안 생성된 emetic toxin에 의한 구토형(emetic type) 식중독으로 분류된다(10). 설사형 식중독은 잠복기가 8-16시간 정도로 설사와 복통이 주 증상이며 여기에 관련된 enterotoxin은 비용혈성 enterotoxin (NHE), 용혈성 enterotoxin (HBL), cytotoxin K, enterotoxin FM (*entFM*) 등이 있으며, 구토형 식중독은 emetic toxin (cereulide, CER)에 의해 발생하며 매우 빠른 1-5시간 정도의 잠복기를 거쳐 구토와 복통 등의 증상을 유발한다(9,11).

*Corresponding author: Tae Sun Kim, Health & Environment Institute of Gwangju, Gwangju 502-837, Korea
Tel: 82-62-613-7692
Fax: 82-62-655-7549
E-mail: kts2877@korea.kr
Received April 4, 2014; revised May 2, 2014;
accepted May 2, 2014

식품의약품안전처의 통계에 의하면 *B. cereus*에 의한 식중독은, 2003년부터 2012년간 52건 1400여명 환자가 발생하였고(3). 다른 식품군에 비해 시중에 유통판매 중인 즉석섭취·편의식품류에 속하는 선식 및 새싹 채소 등에서 상대적으로 많이 분리되고 있다(7,12). 그러나 *B. cereus*에 의한 식중독은 균수가 일정수준 이상 되어야 발병한다고 보고되고 있지만(9), *B. cereus*가 산생하는 독소의 종류에 따라 잠복기 및 임상증상이 다양하기 때문에 원인 병원체 및 독소의 정확한 진단이 중요하다(5,8,10,11).

또한 맛별이 부부 등의 증가로 외식문화 활성화 및 식습관의 서구화로 샐러드 등의 즉석·편의식품 섭취가 꾸준히 증가하고 있어 이러한 식품군에 대한 식중독 원인균 오염여부 등 안정성에 대한 조사가 요구된다. 따라서 본 연구에서는 대형마트 및 일반 음식점에서 판매하고 있는 즉석섭취 및 편의식품류와 식중독이 발생하여 의뢰된 조리식품에서 *B. cereus*의 오염도 및 독소 종류의 분포형태를 파악하고, 더 나아가 독소 산생균의 유전학적 상관관계를 비교분석하여 분자유전학적 특성을 조사함으로써 식중독 예방의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

대상 및 검체 채취

2013년 2월부터 8월까지 7개월간 식품의약품안전처의 식품공전상 분류하고 있는 식품 유형에 따라, 광주지역 소재 백화점, 대형 할인 매장과 일반 음식점에서 판매되고 있는 즉석섭취식품 133건, 편의식품 307건, 식중독이 발생하여 의뢰된 조리식품 179건 등 총 619건을 검체로 사용하였다. 시험에 사용된 검체는 냉장상태를 유지하여 가능한 2시간 이내에 실험실로 운반하여 실험을 실시하였다.

Real-Time PCR을 이용한 *Bacillus cereus* 분리

채취한 식품검체로부터 DNA 분리는 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 식품검체 25 g에 증균배지 tryptic soy broth (TSB,

Oxoid, Hampshire, England) 225 mL를 넣고 균질화 한 다음 37°C에서 18-24시간 배양하였다. 증균 배양액 1 mL를 microcentrifuge tube에 채취하고 멸균 증류수로 2-3회 세척한 다음, *Powerprep*TM DNA Extraction from Tissue kit (Kogenebiotech Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였으며 이를 Real-time PCR을 수행하기 위한 DNA template로 이용하였다.

B. cereus 확인을 위한 Real-Time PCR은 *PowerChek*TM 19 Pathogen Multiplex Real-time PCR kit (Kogenebiotech Co., Ltd.)로, 실시간 중합효소연쇄반응은 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 50°C에서 2분, 95°C/min, 95°C/15 s, 60°C/1 min의 cycle을 40회 반복하여 실시하였다. Real-time PCR을 위한 반응액 조성 및 target gene은 제조사(Kogenebiotech Co., Ltd.)에서 제시한 방법으로 실시하였다.

Bacillus cereus 분리 동정

Real-time PCR에서 유전자가 확인된 양성 식품검체에 대한 식중독 원인균의 분리·동정은 식품의약품안전처의 식품공전 미생물시험법(13)에 근거하여 실시하였다.

B. cereus toxin 유전자 검사

순수 분리된 *B. cereus*의 단독 colony를 각각 tryptic soy agar (TSA, Oxoid)에 30°C/24 h 계대배양한 후, I-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit (iNtron biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 DNA를 추출하여 DNA template로 사용하였다.

*B. cereus*의 독소 유전자를 검출하기 위하여 Yang 등(14), Guinebriere 등(15), Horwood 등(16)의 방법에 따라 수행하였으며 사용한 Primer와 PCR 조건은 Table 1와 같다.

PCR은 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며, PCR 반응 후 최종산물의 확인은 5 µL를 취하여 2% agarose gel에 전기영동한

Table 1. PCR primers and cycling conditions for the detection of toxin-producing *Bacillus cereus*

Primer name	Primer Sequence (5'-3')	PCR cycling conditions	Amplicon size (bp)	Ref
<i>hblA</i>	GATTAATACAGGGGATGGAGAAAC CTGCGTGGACATATAAGTAAGAGC	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→57°C, 60 s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	501	26
<i>nheB</i>	GTCGGATACGCAAAAAGTTCA GCGCCGTAAGCAATAAC	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→57°C, 60s→72°C, 120s) 35 cycles→72°C, 5 min	209	26
<i>nheC</i>	GCTGGGGTGGCAACGAG TCCGCTTTTAATTTTCCACTATCC	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→57°C, 60 s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	414	26
<i>hblD</i>	GACCGCTCAAGAACAAAAGTAGG GCGCCAAGAGCCGAGAGT	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→57°C, 60 s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	738	26
<i>hblC</i>	CCTATCAATACTCTCGCAACACCAAT TTTTCTTGATTCGTCATAGCCATTTCT	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→61°C,45s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	386	26
<i>nheA</i>	ATTACAGGGTTATTGGTTACAGCAGT AATCTTGCTCCATACTCTCTTGGATGCT	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→61°C,45s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	475	26
<i>entFM</i>	CAAAGACTTCGTAACAAAAGGTGGT TGTTTACTCCGCCTTTTACAAACTT	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→61°C,45s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	290	26
<i>bceT</i>	AGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT GIATTTCTTTCCCGCTTGCCTTTT	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→61°C,45s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	701	26
<i>cytK₂</i>	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA GTGTAGCCTGGACGAAGTTGG	94°C, 2 min→(94°C, 60 s→62°C,30s→72°C, 120 s) 35 cycles→72°C, 5 min	585	40
CER	ATCATAAAGGTGCGAACAAGA AAGATCAACCGAATGCAACTG	94°C, 10 min→(94°C, 60 s→52°C, 60 s→72°C, 60 s) 35 cycles→72°C, 5 min	188	41

후 EtBr (1 µL/mL)로 염색하여 UV하에서 확인하였다.

DiversiLab™을 이용한 Repetitive sequence-based PCR (Rep-PCR) DNA fingerprinting

순수 분리된 *B. cereus* 중 구토독소를 가지고 있는 균주와 표준균주 *B. cereus* F4810/72를 각각 tryptic soy agar (TSA, Oxoid, England)에 30°C에서 24 h 배양한 후, UltraClean™ Microbial DNA isolation Kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 이를 DNA template로 사용하였다. Rep-PCR은 DiversiLab™ *Bacillus* Kit (BioMeriex, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 AmpliTaq® polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 0.5 µL (2.5 U), 10× GeneAMP PCR Buffer I (Applied Biosystems) 2.5 µL, primer mix 2 µL, Rep-PCR master mix (MM1) 18 µL가 각각 포함되어 있는 Rep-PCR mixture (DiversiLab™ *Bacillus* Kit)에 genomic DNA 2 µL (약 25 ng/µL)를 넣어 PCR를 수행하였다.

PCR 조건은 94°C에서 5분간 denaturation 후, 94°C/30 s, 55°C/30 s, 70°C/90 s의 cycle을 35회 실시하고, 70°C에서 3분간 반응시켰다. 증폭한 Rep-PCR 반응산물은 micro-fluidics chip (BioMeriex, Marcy l'Etoile, France)과 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Palo alto, CA, USA)을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동 결과는 온라인상의 DivesiLab™ software (version 2.1.66, BioMeriex)에 따라 dendrogram을 작성하여 균주간의 상관관계를 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

*B. cereus*의 분리율

시험에 사용된 식품검체는 식품 공전상 분류하고 있는 식품 유형에 따라, 광주지역 소재 백화점, 대형 할인 매장 및 일반 음식점에서 판매되고 있는 즉석섭취 및 편의식품과 식중독이 발생하여 광주광역시 보건환경연구원에 의뢰된 조리식품 등 식품 총 619건의 검체에서 Real-Time PCR을 이용하여 *B. cereus*를 스크리닝 검사한 결과, 270건의 시료에서 양성으로 판정되었다. 스크리닝 검사 결과에서 양성으로 판정된 시료에 대해 균배양 실험을 실시한 결과 총 263균주의 *B. cereus*를 분리동정하였다(Table 2). 식품유형별 분리율을 살펴보면, 샐러드 및 새싹채소 등 편의식품류에서는 163균주(53.1%), 김밥 및 초밥 등 즉석식품류는 64균주(48.1%), 식중독이 발생하여 의뢰된 조리식품에서는 36균주(20.1%)를 분리하였으며, 전체적으로 즉석섭취와 조리식품보다 편의식품류에서 *B. cereus*의 분리율이 더 높았다($p < 0.001$). Kang 등(12)이 보고한 연구에 따르면, 편의식품에 속하는 새싹채소와 샐러드에서 *B. cereus*의 검출률을 분석한 결과, 새싹채소에서는 50제품 중 29건(58.0%), 샐러드에서는 30제품 중 16건(53.3%)이었다. 한편

Table 2. Distribution of *Bacillus cereus* isolates from foods (n=619)

Food Type	No. of samples	No. of isolates (%)	<i>P</i> value*
Preserved foods ¹⁾	179	36 (20.1)	<0.001
Ready to eat vegetable	307	163 (53.1)	
Ready to eat food	133	64 (48.1)	
Total	619	263 (42.5)	

¹⁾Preserved foods for the investigation of food poisoning outbreak

2011년에 대형할인매장과 백화점 등에서 유통 중인 신선편의 샐러드 제품과 유기농 채소류 76건에 대한 식중독 미생물 오염도를 조사한 결과에 따르면 약 50%에서 *B. cereus*가 검출되었으며, 14.5%가 규격기준(<3 log CFU/g)을 초과하여 부적합 처리되었다(6). 또한, 식사대용으로 많은 사람들이 찾고 있는 선식 161건을 실험한 결과, 57건(35.4%)에서 *B. cereus*가 검출되었다고 보고(7)하여, 검체 수거 시기나 지역별로 약간의 차이는 있지만 대체적으로 본 연구와 즉석섭취 및 편의식품 유형에서의 분리율은 유사한 검사결과를 보였다.

식품의약품안전처의 식품공전에서 제시하는 즉석섭취·편의식품류에 대한 *B. cereus*의 규격기준은 1,000 CFU/g 이하이다(13). 본 실험에서 검사한 식품검체에서는 식품공전상에 공시되어 있는 즉석섭취·편의식품류의 규격기준 범위를 초과한 제품은 없었으나, *B. cereus*균의 오염이 조리식품에 비해 즉석섭취 및 편의식품류에서 약 2배 이상 높았다. 따라서 이러한 제품의 생산단계, 저장 및 유통단계 등에서 위생관리를 잘못했을 경우, 오염된 식품에서 세균의 급속한 성장으로 인하여 식중독을 유발할 수 있기 때문에 철저한 위생관리가 필요할 것으로 생각된다.

*B. cereus*균의 enterotoxin 및 emetic toxin 검출

*B. cereus*가 생산하는 장내 및 구토독소의 유전자 보유여부를 확인하기 위하여 장내독소를 보유하고 있는 *B. cereus* ATCC 11778, ATCC 14579, NCCP 10841과 구토독소를 가지고 있는 *B. cereus* F4810/72를 표준균주로 사용하였다(Table 3). *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *entFM*, *bceT*, *cytK₂*와 같은 9개 장내독소 유전자는 표준균주 *B. cereus* ATCC 11778, ATCC 14579, NCCP 10841에서 검출이 확인된 반면, 구토유전자(CER)는 장내독소 표준균주에서는 확인되지 않았다. 그러나 표준균주 *B. cereus* F4810/72에서는 구토독소 유전자를 검출 확인하였으며, *nheABC*, *entFM* 유전자 같은 장내독소도 확인할 수 있었다. 장내독소의 한 종류인 *nheA*, *nheB*, *nheC*와 *entFM* 유전자는 구토독소를 산생하는 *B. cereus*을 유발한다고 보고하였다(25). 또한, Yang 등(14)은 구토와 설사 증상을 동시에 유발하는 독소형 식중독의 원인이 되는 *B. cereus*를 보고한 바 있다. 이번 연구에서도 *B. cereus* 표준균주가 산생하는 장내독소와 구토독소를 실험하여 보고했던 이전의 연구결과와 비교했을 때, 식품에서 분리된 모든 균주와 마찬가지로 동일한 결과를 얻을 수 있었다(5,17,18).

시중에 유통중인 즉석섭취 및 신선편의식품, 그리고 식중독이 발생하여 의뢰된 조리식품에서 분리한 *B. cereus* 균주에서 각각에 대한 9종류의 장내독소 및 1종류의 구토독소를 분석하였다. 총 263균주 중 장내독소 NHE complex (*nheA*, *nheB*, *nheC*),

Table 3. PCR analysis of toxin genes of *Bacillus cereus* enterotoxigenic and emetic reference strains using the primer sequences used in this study

<i>B. cereus</i> strain	Enterotoxin genes					Emetic toxin genes
	<i>nheABC</i> ¹⁾	<i>hblACD</i> ²⁾	<i>entFM</i>	<i>bceT</i>	<i>cytK₂</i>	CER
ATCC 11778	+	+	+	-	+	-
ATCC 14579	+	+	+	-	+	-
NCCP 10841	+	+	+	+	+	-
F4810/72	+	-	+	-	-	+

¹⁾*nheABC*: *nheA*, *B* and/or *C*

²⁾*hblACD*: *hblA*, *C* and/or *D*

+: detected, -: not detected

Table 4. Detection of toxigenic genes of *Bacillus cereus* strains isolates from foods (n=263)

<i>B. cereus</i> source	NHE Complex (%)			HBL Complex (%)		
	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblD</i>
Preserved foods ¹⁾ (n=36)	36 (100)	35 (97.2)	33 (91.7)	34 (94.4)	33 (91.7)	28 (77.8)
Ready to eat vegetable (n=163)	163 (100)	156 (95.7)	143 (87.7)	144 (88.3)	34 (20.9)	130 (79.8)
Ready to eat food (n=64)	64 (100)	64 (100)	4 (6.3)	47 (73.4)	41 (64.1)	44 (68.8)
Total (n=263)	263 (100)	255 (97.0)	180 (68.4)	225 (85.6)	108 (41.1)	202 (76.8)

¹⁾Preserved foods for the investigation of food poisoning outbreak

HBL complex (*hblA*, *hblB*, *hblD*), *entFM*, *bceT*, *cytK₂* 그리고 구토독소 CER의 검출 결과는 Table 4 및 Table 5와 같다. 본 연구에서는 NHE complex (*nheA*, *nheB*, *nheC*) 중 3개의 *nhe* 유전자를 모두 보유한 *B. cereus*는 236균주(89.7%)로 나타났으며, *nheA*만의 보유한 균주는 2개(0.8%)뿐이었다. 또한 HBL complex (*hblA*, *hblB*, *hblD*) 중 3개의 *hbl* 유전자를 모두 보유한 균주는 175균주 (66.5%), 그리고 한개 혹은 두 개의 *hbl* 유전자를 가진 균주는 59균주(21.7%), 3개 *hbl* 유전자를 모두 가지고 있지 않은 균주는 29균주(11.0%)로 나타났다. 본 연구결과, 다른 이전의 연구(5,18,19)와 마찬가지로 NHE complex 유전자 빈도가 HBL complex 유전자 보다도 더 높게 나타나는 특징을 확인할 수 있었다.

자연환경과 식품에 분리한 대부분의 *B. cereus* 균주 속에는 NHE complex (*nheA*, *nheB*, *nheC*)가 70-100% 정도 존재한다고 보고되었다(19). Kim 등(5)은 *B. cereus* 균주에 존재하는 NHE complex 유전자는 90.9-97.8%가 검출되었으며, 보다 최근의 연구 보고를 보면, Lee 등(20)이 선식에서 *B. cereus*를 조사한 결과, 모든 균주에서 NHE complex 유전자가 검출되었다고 보고 한 바 있다. 본 연구에서도 다양한 식품유형에서 분리한 *B. cereus* 균주 속에 존재하는 NHE complex (*nheA*, *nheB*, *nheC*) 유전자는 98.8-100%가 검출되어 다른 연구보고들과 일치하는 결과를 나타냈다.

HBL enterotoxin complex는 B, L₁, L₂로 구성되어 있으며, *B. cereus* 균주 내에 HBL complex 3개의 유전자가 있을 때 장내독소가 활성화 된다고 보고하였다(21). Zhou 등(22)의 연구에 따르면, 우유에서 분리한 *B. cereus* 균주 속에 HBL 유전자의 빈도는 37.0%에서 71.7%까지 확인되었다. 국내에서의 연구결과를 살펴 보면, 김밥 등 즉석식품과 선식 등의 편의 식품에서 분리된 *B. cereus* 균주 속에 HBL 3개의 유전자의 빈도는 48.7%에서 81.8%로 나타났다(5,20). 본 연구에서도 즉석섭취 및 편의식품에서 분

리한 *B. cereus* 균주 속에 HBL 3개 유전자의 빈도는 71.9-89.0%로 확인되어 다른 연구보고와 유사한 결과를 보였으나, 식중독이 발생하여 의뢰된 조리식품에서 분리된 *B. cereus* 균주에서는 91.7%로 다른 식품유형보다 약간 높게 나타나는 특징이 있었다.

식품에서 분리한 총 *B. cereus* 263개 분리균주의 장내독소 *entFM*, *cytK₂*, *bceT* 유전자의 보유율은 각각 100, 100, 43.0% 순으로 확인되었다. 또한 식품유형에 관계없이 모든 *B. cereus* 균주는 NHE complex 유전자중의 하나인 *nheA*, *entFM*, *cytK₂*는 독소를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 식품뿐만 아니라 환경 등에서 광범위하게 분리된 *B. cereus* 속에 *nhe*, *entFM* 유전자는 거의 모든 균주에서 존재하고 있는 것으로 보고한 이전의 연구(17,19,23)와 일치하였다. 한편, *hbl(A,B,D)* 유전자는 신선편의식품에서 *hblB* 유전자를 제외하고는 모든 식품유형에서 69%에서 94%까지 높게 분포하고 있었는데, 식중독 균주와 식품유래균주에서 비교 실험한 이전의 연구보고(19)에서 73%에서 92%로 높은 검출률을 보인 것과 비교해 볼 때, 유사한 결과를 나타내고 있음을 확인하였다. 그러나, *cytK₂* 유전자는 모든 식품유형 유래 *B. cereus*에서 분리된 모든 균주가 보유하고 있는 것으로 나타나, Hsieh 등(19)이 조사한 식품유래균주에서 73%가 검출된 결과와는 다소 차이가 있었다. *B. cereus* 분리균 내 *bceT* 유전자 보유율은 식중독 발생 식품, 신선편의식품, 즉석섭취식품에서 각각 50.0, 45.4, 32.8% 순으로 확인되었으나, Hsieh 등(19)의 연구보고에서는 식중독과 식품유래식품에서 각각 57, 71%를 보유하고 있어 본 연구에서보다는 더 높게 나타나는 양상을 보였다.

*B. cereus*의 구토독소인 CER 유전자는 식품유형에 따라 식중독 보존식, 즉석섭취식품, 편의식품에서 각각 100, 59.4, 35.6% 순으로 검출되었다. 식품 중 분리한 *B. cereus* 균주가 산생하는 구토독소를 가진 균주 중 8개의 장내독소를 보유하고 있는 *B. cereus*는 29.4%로 확인되었으며, 나머지 균주들도 대부분 5-8개의 장내독소를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 김 등(24)이 보고한 연구에 따르면, 설사환자 및 식품에서 분리한 구토 독소를 산생하는 *B. cereus* 균주중 85%가 1개에서 8개의 장내독소를 보유한 것으로 조사되어, 본 연구와 비교하여 별 차이가 없는 유사한 경향을 나타내고 있음을 확인하였다. 또한, 이번 연구에서 식품 중 분리한 *B. cereus*는 *nheA*, *nheB*, *nheC*와 *entFM* 장내독소 유전자를 가지고 있는 균들이 구토독소를 모두 가지고 있는 것으로 나타나, 국내외의 연구에서 *nheA*, *nheB*, *nheC*와 *entFM* 장내독소 유전자는 *B. cereus*가 생산하는 구토독소를 거의 대부분 보유하고 있다는 이전의 보고(14,15,17)와 유사하였다. 이러한 연구결과는 *B. cereus*에 의한 구토형 식중독에서는 일반적으로 구토와 설사 증상을 동반하여 나타나는 것(14)과 관련이 있을 것으로 생각된다. 한편 본 연구결과에서는 구토 독소를 산생하는 *B. cereus*는 HBL enterotoxin (*hblACD*)을 가지고 있지 않다는 이전의 연구(17)와는 다른 양상을 나타냈다. 그러나 국내의 연구 보고된 결과(24-26)에 따르면, 임상검체와 식품에서 분리한 *B. cereus*가 *hblACD*

Table 5. The Distribution of enterotoxin and emetic toxin genes among *Bacillus cereus* isolated from food samples (n=263)

Toxin gene	No. (%) of <i>B. cereus</i> isolates			Total (n=263)
	Preserved foods ³⁾ (n=36)	Ready to eat vegetable (n=163)	Ready to eat food (n=64)	
<i>nheABC</i> ¹⁾	36 (100.0)	161 (98.8)	64 (100.0)	261 (99.2)
<i>hblACD</i> ²⁾	33 (91.7)	145 (89.0)	46 (71.9)	224 (85.2)
Enterotoxin <i>entFM</i>	36 (100.0)	163 (100.0)	64 (100.0)	263 (100.0)
<i>bceT</i>	18 (50.0)	74 (45.4)	21 (32.8)	113 (43.0)
<i>cytK₂</i>	36 (100.0)	163 (100.0)	64 (100.0)	263 (100.0)
Emetic toxin CER	36 (100.0)	58 (35.6)	38 (59.4)	132 (50.2)

¹⁾*nheABC*: *nheA*, *B* and/or *C*

²⁾*hblACD*: *hblA*, *C* and/or *D*

³⁾Preserved foods for investigation of food poisoning outbreak

Table 6. Profile of enterotoxin and emetic toxin genes in *Bacillus cereus* strains used in this study

Profile	Entrotoxin genes					Emetic toxin genes	No. (%) of <i>B. cereus</i> isolates (n=263)
	<i>nheABC</i> ¹⁾	<i>hblACD</i> ²⁾	<i>entFM</i>	<i>bceT</i>	<i>cytK₂</i>		
I	+	+	+	+	+	+	53 (20.2)
II	+	+	+	+	+	-	55 (20.9)
III	+	+	+	-	+	+	61 (23.2)
IV	+	-	+	+	+	+	3 (1.1)
V	+	+	+	-	+	-	55 (20.9)
VI	+	-	+	-	+	+	15 (5.7)
VII	+	-	+	+	+	-	2 (0.8)
VIII	+	-	+	-	+	-	19 (7.2)

¹⁾*nheABC*: *nheA*, *B* and/or *C*

²⁾*hblACD*: *hblA*, *C* and/or *D*

유전자를 보유하고 있는 것으로 보고한 연구결과와 유사한 경향을 나타내고 있음을 확인하였다. 한편 이러한 연구 결과는 식품에서 분리한 *B. cereus*가 대부분 구토 독소를 산생하여 설사형 및 구토형 식중독을 동시에 유발할 수 있는 잠재적인 원인이 될 수 있을 것으로 생각된다.

B. cereus 생산 enterotoxin 및 emetic toxin genes profile

식품유형에 따라 분리된 총 *B. cereus* 263개 분리균주를 대상으로 실험한 toxin 유전자는 9개의 장내독소와 1개의 구토독소의 존재 유무에 따라 8개 profile로 분류되었다(Table 6). 이 중 Profile III은 장내독소 유전자에 속하는 *nheABC*, *hblACD*, *entFM*, *cytK₂*와 구토독소 CER 유전자를 가지고 있는 유형으로, 검사균주 중 23.2%가 이 유형으로 나타나 가장 높은 보유율을 보였다. 장내독소 및 구토독소 유전자를 모두 보유하는 Profile I은 20.2%를 차지하였으며, Profile II는 구토독소를 제외한 9개의 장내독소를 가지고 있는 유형으로 20.9%를 차지하였다. 다른 Profile은 7% 이하로 나타났다. 특히 4개의 주요한 Profile (I, II, III, V)은 장내독소 유전자인 *nheABC*, *hblACD*, *entFM*, *cytK₂* 유전자 모두 가지고 있는 유형으로 총 224균주(85.1%)에서 확인되었다. Kim 등(5)의 연구에서도 임상검체와 식품에서 분리한 *B. cereus*에서 *nheABC*, *hblACD* 장내독소는 79.2% (120분리균주 중 95균주)가 검출되어 본 연구 결과와는 유사한 경향을 나타냈다. *nheABC*, *hblACD* 유전자는 주요한 장내독소 유전자로, 특히 *B. cereus*로 인한 설사형 식중독의 1차적인 병원성인자라고 보고(8,9,18) 되고 있는데, 이러한 의미에서 식품이나 환경에 오염된 *B. cereus* 균주가 어떠한 경로를 거쳐서든 식중독을 유발할 수 있는 가능성을 지니고 있기 때문에 식품의 가공 및 저장과정에서 보다 철저한 위생관리 및 주의가 필요할 것으로 사료된다.

DiversiLab™을 이용한 Rep-PCR DNA fingerprinting

구토독소를 보유하고 있는 *B. cereus* 중 식중독이 발생하여 의뢰된 조리식품 35주, 편의식품 58주, 즉석섭취식품 37주 등 총 130균주와 유전학적 상관성을 조사하기 위해 표준균주 *B. cereus* F4810/72 1주를 포함하여 DiversiLab™ Rep-PCR로 분석한 결과, 매우 다양한 전기영동유형을 관찰할 수 있었다. PCR 산물은 모두 100 bp에서 5000 bp 사이에서 확인되었으며 분석한 *B. cereus*의 유전자 상동성은 35% 정도로 유전적으로 매우 다양하게 나타나, 구토독소를 보유한 식품군별 및 식품유형별에 따른 유전학

적 상관관계는 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 대형마트 등에서 유통 중인 선식에서 분리한 *B. cereus*를 대상으로 Rep-PCR을 실시한 결과, 각각 31.4%(20)와 45%(27)의 유전적 상동성으로 독소유형 및 항생제 내성에 따른 상관관계가 없었다는 연구보고와 일치하였다.

분자역학적 분석방법은 병원체의 유전적 다양성에 기초하여 그들의 특성을 규명하는 방법으로 크게 분류(classification)와 유형(typing)으로 구별된다. 분류는 같은 그룹 사이에 종을 세분화하고 그들이 진화하는 변화를 관찰하는 방법으로 오랜 연구기간이 요구되는 반면, 유형분석은 같은 종에서 임상 분리주 및 환경 분리주의 차이점을 분석하는데 훨씬 더 유용하며 비교적 분석시간이 짧은 장점이 있다. 이러한 유형분석에 이용되는 방법에는 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)나 Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD), Repetitive sequence-based PCR (Rep-PCR)법 등이 있다(28).

현재, Rep-PCR은 컴퓨터 분석시스템으로 이루어져, 재현성이 높고 빠른 시간내에 비교적 간단히 유형을 분석할 수 있기 때문에 PFGE 분석이 어렵고 복잡한 균종에 많이 사용되고 있는 분자적 수준의 분석방법(27,29,30)이다. 이러한 이유로 Cherif 등(31)은 *Bacillus* 종의 유전적 다양성을 분석하는데 Rep-PCR 방법이 매우 유용하다고 보고하였다. 그러나 Lee 등(20) 및 Chon 등(27)의 결과와 마찬가지로, 본 연구결과에서 식품유형간의 상동성이 매우 낮아 Rep-PCR 방법만으로는 다양한 식품유래 *B. cereus*의 유전적 상관관계를 규명하기는 매우 제한적이라 판단된다. 그렇지만, 식중독 예방을 위한 조기감지와 모니터링, 식중독 발생 시 환자 및 식품 분리주와의 연관관계 등을 신속하게 파악하기 위한 표준 수단 등으로는 적용가능 할 것으로 생각된다.

요 약

즉석섭취·편의식품은 일반적으로 소비자가 별도의 조리과정 없이 직접 신선한 상태로 섭취하기 때문에 병원성 미생물에 오염되어 있을 경우 식중독을 일으킬 수 있다. 특히 *B. cereus*는 자연계에 널리 분포하여 대부분의 식품에 쉽게 오염되어 식중독을 유발시킬 수 있는 독소형 식중독균 중의 하나이다. 이에 본 연구는 유통 판매중인 즉석섭취·편의식품류 및 식중독이 발생하여 의뢰된 보존식에서 *B. cereus*의 분리율 및 독소 종류의 분포 형태를 파악하였다. 식품 총 619건 중 263건(42.5%)의 *B. cereus*를 분리하였지만, 식품의약품안전처의 식품공전에서 즉석섭취·편의식품류에 대한 *B. cereus*에 대한 규격기준이 1,000 CFU/g 이하로, 본 실험에서는 규정 범위를 초과한 식품은 없었다. *B. cereus* 총 263개 분리균주에 대한 9종류의 장내독소 및 1종류의 구토독소를 분석한 결과, NHE complex (*nheA*, *nheB*, *nheC*)중 3개의 *nhe* 유전자를 모두 보유한 *B. cereus*는 236개 균주(89.7%), 1개만의 독소를 가지고 있는 균주는 2개(0.8%)뿐이었다. 또한, HBL complex (*hblA*, *hblB*, *hblD*) 중 3개의 *hbl* 유전자를 보유한 균주는 175개 균주(66.5%), 그리고 한개 혹은 두 개의 *hbl* 유전자를 가진 균주는 59개 균주(21.7%), 3개 유전자를 모두 가지고 있지 않은 균주는 29개 분리균주(11.0%)로 나타났다. NHE complex 유전자의 빈도가 HBL complex 유전자 보다 더 높게 나타나는 특징을 확인할 수 있었다. 장내독소 *entFM*, *cytK₂*, *bceT* 유전자의 보유율은 각각 100, 100, 43.0% 순으로 확인되었다. *B. cereus*의 구토 독소인 CER 유전자는 평균 50.2%를 보유하고 있었으며, 식품유형에 따라 식중독 보존식, 즉석섭취 식품, 편의식품에서 각각 100, 59.4, 35.6% 순으로 나타났다. 식품 중 분리한 *B.*

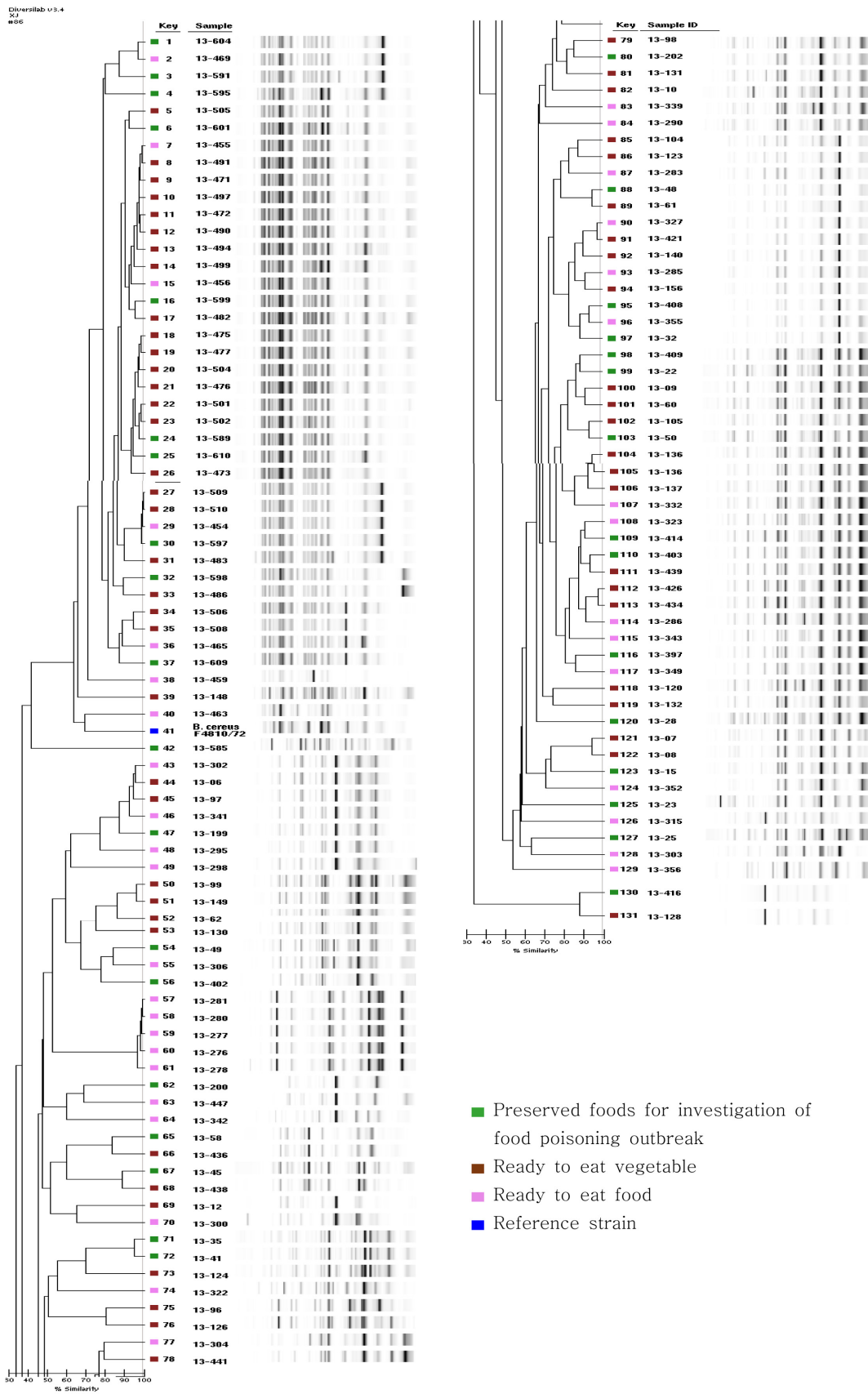


Fig. 1. The DiversiLab™ systems results (Dendrogram and virtual gel image) for *B. cereus* strains isolated from diverse food samples.

*cereus*가 산생하는 구토독소를 가지고 있는 *B. cereus* 균주 중 29.4%에서 8개의 장내독소를 보유하고 있었으며, 나머지 균주들도 대부분 5-8개의 장내독소를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구 결과를 종합해보면, 식품에서 분리한 *B. cereus*는 대부분의 균주가 설사형 및 구토형 독소를 보유하고 있어, 즉석 섭취·편의식품의 미생물 오염 요인들은 계절에 관계없이 지속적으로 위생적인 관리가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 식품의 미생물적 안전성 확보를 위해서는 업체의 생산단계부터 저장 및 운반을 포함한 유통단계 등에서 식중독을 유발 할 수 있는 오염원들이 내재되어 있기 때문에 철저한 개인 및 환경 위생관리가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 광주광역시보건환경연구원 연구사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Bahk GJ, Chun SJ, Park KH, Hong CH, Kim JW. Survey on the foodborne illness experience and awareness of food safety practice among Korean consumers. *J. Fd. Hyg. Safety.* 18: 139-145 (2003)
- Choi JW, Park SY, Yeon JH, Lee MJ, Chung DH, Lee KH, Kim MG, Lee DH, Kim KS, Ha SD. Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in Markets. *J. Fd. Hyg. Safety.* 20: 43-47 (2005)
- Ministry of food and drug safety. Available from: <http://www.mfds.go.kr/e-stat/index.do>. accessed Dec. 31, 2013.
- Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Mahon BE. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis.* 19: 1-9 (2013)
- 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.* 76: 25-29 (2011)
- Jo MJ, Jeong AR, Kim HJ, Lee NR, Oh SW, Kim YJ, Chun HS, Koo MS. Microbiological quality of fresh-cut produce and organic vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 91-97 (2011)
- Cho YS, Jung EY, Lee MK, Yang CY, Shin DB. Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from Sunshik. *J. Fd. Hyg. Safety.* 23: 343-347 (2008)
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2: 189-198 (2000)
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 579-606 (2008)
- Drobniewski FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 324-338 (1993)
- Ehling-Schulz M, Guinebretiere MH, Monthan A, Berge O, Fricker M, Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxin and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 232-240 (2006)
- Kang TM, Cho SK, Park JY, Song KB, Chung MS, Park JH. Analysis of microbial contamination of sprouts and fresh-cut salads in a market. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 490-494 (2011)
- Ministry of Food and Drug Safety. Korean Food Standard Code. 5-29-34-35. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2012)
- Yang IC, Shih DY, Huang TP, Huang YP, Wang JY, Pan TM. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J. Food Protect.* 68: 2123-2130 (2005)
- Guinebretiere MH, Fagerlund A, Granum PE, Nguyen-The C. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 74-80 (2006)
- Horwood PF, Burgess GW, Oakey HJ. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 319-324 (2004)
- Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindbeck T, Andersson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, Mrtlbauer E, Nguyen-The C, Salkinoja-Salonen M, Scherer S. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 151: 183-197 (2005)
- Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikam C, Ohba M, Assavanig A, Panbangred W. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 352-356 (2008)
- Guinebretiere MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3053-3056 (2002)
- Lee N, Sun JM, Kwon KY, Kim HJ, Koo M, Chun HS. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from Sunsik. *J. Food Protect.* 75: 225-230 (2012)
- Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 63: 4423-4428 (1995)
- Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 195-200 (2008)
- Hsieh YM, Sheu SJ, Chen YL, Tsen HY. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and foodborne outbreaks. *J. Appl. Microbiol.* 87: 481-490 (1999)
- Kim JB, Kim JM, Kim CH, Seo KS, Park YB, Choi NJ, Oh DH. Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 182-186 (2010)
- Rahmati T, LabbR. Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. *J. Food Protect.* 71: 1178-1185 (2008)
- Chon JW, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Song KY, Park C, Seo KH. Prevalence, phenotypic traits and molecular characterization of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains isolated from human stools in Korea. *J. Appl. Microbiol.* 112: 1042-1049 (2012)
- Chon JW, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Seo KH. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiol.* 32: 217-222 (2012)
- Achtman M, van der Ende A, Zhe P, Koroleva IS, Kusecek B, Morelli G, Schuurman IG, Bieske N, Zurth K, Kostyukova NN, Paltonov AE. Molecular epidemiology of serogroup a meningitis in Moscow, 1969 to 1997. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 420-427 (2001)
- Healy B, Mullane N, Collin V, Mailler S, Iversen C, Chatellier S, Storrs M, Fanning S. Evaluation of an automated repetitive sequence-based PCR system for subtyping *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Protect.* 71: 1372-1378 (2008)
- Hyeon JY, Chon JW, Hwang IG, Kwak HS, Kim MS, Kim SK, Choi IS, Song CS, Park C, Seo KH. Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in retail meat products. *J. Food Protect.* 74: 161-166 (2011)
- Cherif A, Brusetti L, Borin S, Rizzi A, Boudabous A, Khyami-Horani H, Daffonchio D. Genetic relationship in the '*Bacillus cereus* group' by Rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific Rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1108-1119 (2003)