pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 1, pp. 50~56 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.1.50

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

약수터 음용도구의 *Bacillus cereus* 분포 및 독소 특성

조아현 · 최하나 · 허단비 · 권순목 · 김중범*
순천대학교 식품공학과

Prevalence and Toxin Characteristics of *Bacillus cereus* Isolated from Drinking Cups in Spring

Ah-Hyeon Jo, Ha-Na Choi, Dan-Bi Heo, Sun-Mok Kwon, and Jung-Beom Kim*
Department of Food Science and Technology, SunChon National University
(Received October 19, 2016/Revised November 7, 2016/Accepted December 19, 2016)

ABSTRACT - The purpose of this study was to investigate the microbiological contamination of water and drinking cups in springs and to estimate the toxin gene, enterotoxin production ability and antibiotic susceptibility of food-borne pathogens. Ten spring water and 34 drinking cups were tested. The average number of total aerobic bacteria and coliform bacteria in spring water were 1.8 log CFU/mL and 1.2 log CFU/mL, and in drinking cups were 4.7 log CFU/100 cm^2 and 1.7 log CFU/100 cm^2. *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* were not isolated from all of samples but *Bacillus cereus* was detected in 5 (14.7%) of 34 drinking cups. The *nheA* and *entFM* genes were major enterotoxin genes in *B. cereus* isolated from drinking cups. All of *B. cereus* tested in this study produce non-heamolytic enterotoxin but only 2 isolates possessed heamolysin BL enterotoxin producing ability. *B. cereus* was resistant to β-lactam antibiotics. These results revealed that the sanitary conditions of drinking cups in spring should be improved promptly. The substitution carrying a personal drinking cup for the public drinking cups equipped in springs is suggested to prevent food-borne illness.

Key words : spring water, drinking cup, *Bacillus cereus*, contamination

약수란 땅속에 스며든 하천 및 호수 등의 지표수에 각종 미네랄, 탄산가스, 산소 등이 용해되어 있는 지하수가 지표로 다시 용출되어진 광천수를 지칭 한다[1]. 약수는 또한 일반 먹는 물에 비해 탄산가스, 산소 용해도가 높고 칼슘, 마그네슘, 철분 등의 미네랄 함량이 높아 특정 질병에 대한 완화효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다[2]. 이러한 약수의 장점에 따라 약수를 가정 내 먹는 물로 사용하는 경우가 증가하고 산책과 등산 등 여가활동 인구가 증가함에 따라 약수에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있다[1]. 현재 약수의 의미는 여가생활을 즐기는 국민들에게 맑고 깨끗한 물을 공급하기 위한 목적으로 도심지역 산책로와 산악지역 등산로 및 사찰 내 자연적으로 조성된 샘물을 모두 지칭하게 되었다[2].

*Bacillus cereus*는 토양 상재균으로 자연계에 널리 분포하고 있으며 곡류, 유제품, 채소류 등 다양한 식품과 식품기계, 용기에 오염되어 있다[3]. *B. cereus*는 *hbl* enterotoxin gene에서 유래하는 hemolysin BL (HBL), *nhe* enterotoxin gene에서 유래하는 nonhemolytic enterotoxin (NHE), *entFM* enterotoxin gene에서 유래하는 enterotoxin FM (EntFM), *cytK* enterotoxin gene에서 유래하는 cytotoxin K (CytK) 등의 설사독소와 *ces* emetic toxin gene에서 유래하는 cereulide 구토독소를 생산 식중독을 발생시킨다[4]. *B. cereus* 식중독은 일반적으로 3일내에 자연적으로 치료되는 것으로 보고되고 있으나 최근 유럽에서 *B. cereus*와 관련된 식중독사고로 사망자가 발생하는 등 식품안전에 관한 *B. cereus* 위해성이 증대되고 있다[5,6].

약수에 대한 수요가 증가하고 약수터 숫자가 증가함에 따라 정부에서는 약수에 대해 주기적 안전관리를 실시하여 맑고 깨끗한 약수를 공급하기 위해 노력하고 있다[7]. 그러나 2009년 환경부에서 전국 1,574개의 약수터를 조사한 결과 358개소의 약수가 먹는 물 수질기준을 초과하여 안전성에 문제점을 나타내었으며 부적합의 가장 큰 원인은 일반세균수와 대장균군수 등 미생물 항목이라고 발표했

*Correspondence to: Jung-Beom Kim, Department of Food Science and Technology, SunChon National University, 255 Jungang-ro, Suncheon, Jeonnam 57933, Korea
Tel: 82-61-750-3259, Fax: 82-61-750-3208
E-mail: okjbkim@sunchon.ac.kr

다[7]. 이러한 원인은 지속적인 살균 소독을 거쳐 공급되는 상수도와 달리 빗물, 하천수, 호소수 등 지표수와 야생동물의 배설물 등의 유입을 완전히 차단하지 못하는 약수의 입지적 조건에 기인하는 것이 한 가지 원인으로 분석되었으며, 약수터 음용도구 등 주변 환경에 대한 청결유지를 지속적으로 관리하지 못하는 것이 또 다른 원인으로 분석되었다. 따라서 약수의 안전성을 확보하기 위해서는 빗물, 하천수, 호소수 등 지표수와 야생동물 분변 유입에 따른 미생물 오염도를 주기적으로 점검하여 약수 자체의 미생물 안전성을 확보하여야 하며 약수를 음용할 때 사용하는 음용도구를 포함해 약수터 청결유지에 각별한 주의가 필요하다 하겠다. 그러나 현재까지 연구를 살펴보면 약수에 대한 이화학적특성, 미생물학적 안전성, 지역별 약수의 맛 평가, 약수에서 분리된 균종의 생화학적 특성 등 약수 자체에 대한 이화학적 특성과 미생물학적 안전성 연구[7-11]에 한정되어 있고 음용도구를 포함한 약수터 청결관리에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 약수와 더불어 약수터 음용도구의 일반세균수, 대장균군수 및 식중독세균 오염도를 평가하여 약수와 음용도구의 미생물학적 안전성을 평가하고자 하였다.

Materials and Methods

연구대상 및 시료채취

2016년 4월부터 5월까지 전라남도 순천시 일원의 공용 약수터 및 관광지 약수터 10곳의 약수 10건과 약수터에 비치되어 있는 음용도구 34건을 실험대상으로 하였다. 미생물 오염도 실험을 위하여 약수는 멸균된 채수 용기를 이용하여 채취하였으며 음용도구는 음용 시 입이 접촉하는 음용도구의 윗부분으로부터 2 cm까지 내면을 멸균 면봉으로 swab한 후 면봉을 saline 10 mL에 넣어 저온 아이스박스에 보관하였다. 보관된 약수와 음용도구 표면을 sweb한 saline은 3시간 이내에 실험실로 운반하여 시험용액으로 사용하였다.

미생물 오염도 측정

일반세균수 및 대장균군수는 식품공전[12]에 따라 실험하였다. 멸균인산완충액을 이용하여 10단계 계단 희석된 각각의 시험용액과 계단 희석액을 멸균 petri dish에 1 mL씩 분주하였다. 일반세균수는 standard plate count agar (Oxoid, Basingstoke, England)를 멸균 petri dish 2매에 무균적으로 분주한 후 35°C에서 48시간 배양하였고, 대장균군수는 desoxycholate lactose agar (Oxoid)를 멸균 petri dish 2매에 무균적으로 분주한 후 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 평판 중 30~300개의 집락을 형성한 평판을 선택하여 일반세균수와 대장균군수를 계수하였다.

식중독 미생물 분리 동정

식중독 미생물은 식품공전에[12] 따라 실험하였으며 *Salmonella* spp.는 buffered peptone water (Oxoid) 10 mL에 시험용액 1 mL를 첨가하여 36°C에서 18시간 배양하였다. 1차 증균된 배양액 0.1 mL를 10 mL의 rappaport-vassiliadis broth (RV; Oxoid)에 접종하여 42°C에서 20시간 배양하였다. 2차 증균된 배양액 한 백금이를 macconkey agar (Oxoid)에 도말하여 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양결과 흰색 집락을 선별하여 API 20E test kit (bioMerieux, Marcyl'Etoile, France)를 이용하여 *Salmonella* spp.를 동정하였다[13]. *Staphylococcus aureus*는 NaCl이 10% 첨가된 10 mL tryptic soy broth (TSB; Oxoid)에 시험용액 1 mL를 접종하여 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양액 한 백금이를 난황 첨가 baird-parker agar (BAP; Oxoid)에 도말하여 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양 결과 혼탁한 백색환을 나타내는 검은색 집락을 선별하여 API staph test kit (bioMerieux)를 이용하여 *S. aureus*를 동정하였다[14]. *Bacillus cereus*는 시험용액 0.1 mL를 *Bacillus cereus* rapid agar (BACARA; AES Chemunex, France)에 도말하여 30°C에서 18시간 배양하였다. 배양 후 오렌지색의 혼탁한 환을 갖는 집락을 선별하여 API 50CHB와 API 20E test kit (bioMerieux)를 이용 *B. cereus*를 동정하였다[15].

E. coli O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* 등 기타 식중독 세균은 powerchek™ multipex pathogen detection kit (Kogenbiotech, Seoul, Korea)를 이용하여 확인하였으며 polymerase chain reaction 조건은 제조사의 방법에 따라 실시하였다.

독소 유전자 및 독소 단백질 생산 확인실험

B. cereus 식중독균으로 분리 동정된 균주의 독소 유전자 및 독소 단백질 생산을 확인하기 위하여 분리 균주를 tryptic soy agar (TSA; Oxoid)에 접종하여 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양된 집락 중 한 개의 집락을 선택하여 멸균증류수가 500 μL 첨가되어있는 effendrop 튜브에 부유시킨 후 100°C에서 10분간 열처리하여 10,000 × g에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리된 튜브의 상층액을 취하여 DNA 농도가 1 μg/mL가 되도록 희석한 후 template로 사용하였다[15]. *B. cereus* 독소 유전자는 powerchek™ *Bacillus cereus* toxin 6-plex detection PCR kit (Kogenbiotech)와 thermal cycler (Mastercycler Gradient S)를 이용 denaturation 95°C, 10분, amplification (95°C, 30초, 60°C, 30초, 72°C, 30초) 35 cycle, extension 72°C, 10분 제조사의 방법에 따라 실험하였다. 증폭된 독소 유전자를 확인하기 위하여 증폭산물을 dyne loading STAR (DyneBio, Seoul, Korea)에 혼합한 후 2% agarose gel에 loading하여 전기영동 하였으며 transilluminator (Gel Doc 2000; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용 각각 독소유전자를 확인하였다[16]. *B.*

cereus 14579와 F4810/72 를 대조균주로 사용하였다.

독소 단백질 생산을 실험하기 위해 분리 동정된 *B. cereus* 식중독 균주를 TSB (Oxoid)에 접종하여 35ºC에서 24시간 배양하였다. 배양액은 3,000 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 독소 단백질 생산 확인 실험에 사용하였다. *B. cereus* 식중독 균주가 생산하는 대표적 장독소인 HBL은 *B. cereus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit (BCET-RPLA; Oxoid)를 사용하여 확인하였고, NHE은 *Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay kit (BDE-VIA; Tecra international pty Ltd., Reading, U.K.)를 이용 확인하였다. 각각 kit를 이용한 독소단백질 확인실험은 제조사의 방법에 따라 실시하였다.

항생제 감수성 실험

B. cereus 식중독균으로 분리 동정된 균주의 항생제 감수성 실험은 Vitek-II system과 AST card (bioMérieux)를 이용하여 제조사가 권고하는 방법에 따라 실시하였다. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guideline에는 *B. cereus* 식중독균에 대한 항생제 감수성기준이 아직 설정되어 있지 않아 *S. aureus* 식중독균의 항생제 감수성기준을 적용 판단하였다[17]. 사용된 항생제는 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, oxacillin, benzylpenicillin, rifampin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, vancomycin으로 *S. aureus* ATCC 25923을 대조균주로 사용하였다.

Table 2. Comparison of microbial contamination of drinking cup in spring located at public place and in temple

Samples	Total aerobic bacteria		Coliform bacteria	
	Mean[1)]	Range	Mean	Range
Public place (n = 19)	4.5[a]	2.3~6.4	1.3[b]	ND[2)]~3.0
Temple (n = 15)	4.9[a]	3.5~6.2	2.2[c]	ND~3.3

[1)]Unit: log CFU/100 cm^2 in cup.
[2)]ND: Not detected (detection limit: < 1.0 log CFU in cup).
[3)]Different superscripts on the letters are significantly different ($p < 0.05$).

통계 분석

실험 데이터의 평균값에 대한 유의관계를 검증하기 위해 SPSS (Statistics 14.0 Professtional Pack)를 이용하여 Levene의 등분산 검정을 수행한 후 독립표본 T 검정을 실시하였다. T 검정결과 $p < 0.05$일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

Results and Discussion

약수 및 음용도구의 미생물 오염도

약수와 약수터 내 음용도구 중 미생물 오염도를 분석하고자 일반세균수 및 대장균군수를 실험하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 약수의 경우 일반세균수는 불검출에서 2.8 log CFU/mL 범위에 평균 1.8 log CFU/mL 검출되었고 음용도구의 경우 2.3~6.4 log CFU/100 cm^2 범위에 평균 4.7 log CFU/100 cm^2 검출되었다. 위생지표미생물인 대장균군의 경우 약수는 불검출에서 2.2 log CFU/mL 범위에 평균 1.2 log CFU/mL 검출되었고 음용도구는 불검출에서 3.3 log CFU/100 cm^2 범위에 평균 1.7 log CFU/100 cm^2 검출되었다. 대장균군 검출율을 살펴보면 약수 10건 중 4건에서 대장균군이 검출되었고 음용도구 34건 중 25건(73.5%)에서 검출되어 음용도구의 대장균군 검출율이 매우 높게 나타났다. 음용도구 중 미생물 오염도를 공중 약수터와 사찰 내 약수터로 구분하여 분석해 보면 공중 약수터 내 음용도구의 일반세균수는 평균 4.5 log CFU/100 cm^2 검출되었고 사찰 내 약수터 음용도구는 평균 4.9 log CFU/100 cm^2 검출되었다(Table 2). 대장균군수의 경우 공중 약수터 내 음용도구는 평균 1.3 log CFU/100 cm^2 검출되었고 사찰 내 약수터 음용도구는 평균 2.2 log CFU/100 cm^2 검출되어 사찰 내 약수터 음용도구가 공중 약수터 음용도구보다 미생물 오염도가 높게 나타났다.

약수의 일반세균수 오염도를 먹는 물 음용기준인 100 CFU/mL와 비교할 때 10건의 약수 중 공중 약수터 약수 1건과 사찰 내 약수터 약수 1건, 총 2건이 음용 기준을 초과하여 위생초치가 필요한 것으로 판단되었다. 식품에 사

Table 1. Microbiological evaluation of drinking water and cup in spring

Samples	Total aerobic bacteria		Coliform bacteria		*Bacillus cereus*[3)]	
	Mean[1)]	Range	Mean	Range	Detection samples	Detection rate (%)
Drinking water (n = 10)	1.8[a]	ND[2)]~2.8	1.2[c]	ND~2.2	-	-
Drinking cup (n = 34)	4.7[b]	2.3~6.4	1.7[d]	ND~3.3	5	14.7
Total (n = 44)	3.9	ND~6.4	1.4	ND~3.3	5	11.4

[1)]Unit: log CFU/mL in water and log CFU/100 cm^2 in cup.
[2)]ND: Not detected (detection limit: zero in water and < 1.0 log CFU in cup).
[3)]*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* were tested but *Bacillus cereus* only detected.
[4)]Different superscripts on the letters are significantly different ($p < 0.05$).

용되는 기구 및 용기 표면의 일반세균수는 2.7 log CFU/100 cm^2 미만이어야 안전하다는 Harrigan과 McCance의 보고[18]와 약수터 음용도구에서 검출된 일반세균수 평균 4.7 log CFU/100 cm^2 결과를 비교할 때 음용도구 중 일반세균수 오염도는 매우 높게 나타났다. 또한 34건의 음용도구 중 33건 (97.1%)이 2.7 log CFU/100 cm^2 이상의 오염도를 나타내어 약수터 음용도구에 대한 위생조치가 필요한 것으로 판단되었다. 위생지표미생물인 대장균군의 경우 식품에 사용되는 기구 및 용기 표면에 1.0 log CFU/100 cm^2 미만이어야 안전하다는 Harrigan과 McCance의 보고[18]와 약수터 음용도구에서 검출된 대장균군수 평균 1.7 log CFU/100 cm^2 결과를 비교할 때 대장균군수 오염도는 높게 나타났다. 또한 34건의 음용도구 중 25건 (73.5%)이 1.0 log CFU/100 cm^2 이상의 오염도를 나타내었다. 이러한 결과는 약수터의 음용도구에 대한 위생관리가 이루어지지 않고 다수의 사람이 공동으로 사용하기 때문인 것으로 판단되며 약수터 음용도구에 대한 즉각적인 개선조치가 필요한 것으로 판단되었다.

약수 및 음용도구의 식중독 미생물 오염도

공중 약수터와 사찰 내 약수터의 약수와 음용 도구 중 식중독 미생물 오염도를 분석하고자 *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*를 실험한 결과 약수와 음용 도구에서 *Y. enterocolitica* 등 6종의 식중독 미생물은 검출되지 않았으나, *B. cereus*가 음용 도구 34건 중 5건 (14.7%) 검출되었다(Table 3). 약수터 위치별로 구분해 보면 공중 약수터 음용도구 19건 중 4건 (21.1%), 사찰 내 약수터 음용도구 15건 중 1건 (6.7%)에서 *B. cereus*가 검출되어 사찰 내 약수터 보다 공중 약수터 음용도구의 식중독 미생물 검출율이 높게 나타났다. 약수터 음용도구에 관한 식중독 미생물 연구는 매우 미약하여 직접적인 비교가 곤란하나 45.7%의 어린이 손에서 *B. cereus*가 검출되었다는 보고와[19], 어린이집 사용 수건 50.0%에서 *B. cereus*가 검출되었다는 보고에[20] 비해 낮은 결과이다. 그러나 어린이집 유아 사용 칫솔 75건 중 1건 (1.3%), 양치 컵 65건 중 2건 (3.1%)에서 *B. cereus*가 검출되었다는 보고[21]에 비하면 매우 높은 수준으로 나타났다. 이러한 결과는 자연계에 널리 분포하고 있는 *B. cereus*의 특징과 음용도구 이용 시 사람 손에 의한 교차오염에 의해 나타난 결과로 판단된다. 약수를 음용하기 위해 입과 직접 접촉하는 음용도구의 특성을 고려할 때 약수터 음용도구에 의한 식중독 위험성은 상존한다고 할 수 있겠다. 따라서 식중독 발생을 예방하기 위하여 약수터 음용도구의 철저한 위생관리가 필요하며 살균, 소독 등 음용도구 관리가 곤란할 경우 약수터에 음용도구를 비치하지 말고 개인이 직접 컵을 지참하여 약수를 음용하도록 개선하여야 할 것으로 판단되었다.

독소 유전자 및 독소 단백질 생산능

B. cereus 식중독 미생물의 독소 유전자와 독소 단백질 생산능 실험결과는 Table 3에 나타내었다. *B. cereus*는 구토형과 설사형 식중독을 일으키며 *cer* 구토 독소 유전자와 *nheA*, *entFM*, *hblC*, *cytK, bceT* 설사 독소 유전자가 주요 독소 유전자로 보고되고 있다[15]. 약수터 음용도구에서 분리된 모든 *B. cereus*에서 구토 독소 유전자인 *cer*은 검출되지 않았으며 설사 독소 유전자인 *nheA*와 *entFM*는 5균주 모두에서 검출되었다. 또한 *hblC*, *bceT* 설사 독소 유전자는 2 균주에서 나타났으며, *cytK*는 1균주에서 검출되었다. 이러한 결과는 국내에서 분리된 *B. cereus*의 경우 *nheA*, *hblC* 유전자가 주요 독소 유전자라는 보고에[22] 비해 *hblC* 독소 유전자 보유율은 낮게 나타났으며 *entFM* 독소 유전자 보유율은 높게 나타났다. 어린이집 유아 사용 양치 컵에서 분리된 *B. cereus*의 주요 독소 유전자는 *nheA*

Table 3. Toxin genes profiles and enterotoxin production of *Bacillus cereus* isolated from drinking cup in spring

Isolates	Spring site	Toxin gene						Enterotoxin	
		hblC	*nheA*	*entFMC*	*cytK*	*bceT*	*cer*	HBL[1)]	NHE[2)]
Drinking cup-32	In temple	+[3)]	+	+	+	+	-	+	+
Drinking cup-52	Public place	-[4)]	+	+	-	-	-	-	+
Drinking cup-103	Public place	-	+	+	-	-	-	-	+
Drinking cup-104	Public place	-	+	+	-	-	-	-	+
Drinking cup-105	Public place	+	+	+	-	+	-	+	+
Detection rate (%)		40	100	100	20	40	0	40	100

[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.

와 *entFM* 이라는 보고[21]와 일치하는 결과이다. 약수터 음용도구로부터 분리된 *B. cereus* 5균주의 독소 유전자 검출율을 종합해 보면 한 가지 이상의 독소 유전자를 보유하고 있어 식중독 위험성은 상존하는 것으로 판단되었다.

*B. cereus*의 대표적 설사 독소는 non-hemolytic enterotoxin (NHE)과 hemolysin BL enterotoxin (HBL)으로 보고되고[23] 있으며 NHE는 *nheA*, *nheB* 및 *nheC* 설사 독소 유전자로부터 생산되고, HBL은 *hblA*, *hblC* 및 *hblD* 설사 독소 유전자로부터 생산되는 것으로 보고되고[24] 있다. 음용 도구에서 분리된 *B. cereus* 5균주는 모두 NHE 설사 독소를 생산하였으나 HBL은 2균주에서만 검출되었다. 이러한 결과는 어린이집 유아 양치 컵에서 분리된 *B. cereus* 설사독소 실험결과 NHE 설사독소만 생산하였다는 보고[21]에 비해 높은 검출율이나 국내에서 분리된 *B. cereus*가 HBL 또는 NHE 설사독소 중 한 가지 이상을 생산한다는 보고와[20,24] 일치하는 결과이다. 약수터 음용도구에서 분리된 *B. cereus*의 독소 단백질 생산능을 분석한 결과 한 가지 이상의 독소 단백질을 생산하여 식중독 위험성이 상존하는 것으로 판단되었다. 따라서 다중이 사용하는 약수터 음용도구의 경우 지속적인 위생관리가 필요하며 위생관리가 곤란할 경우 개인 컵을 이용하거나 미생물 안전성을 확보할 수 있는 음용도구 개발이 필요한 것으로 판단되었다.

항생제 감수성

*B. cereus*의 항생제 감수성 실험결과는 Table 4에 나타내었으며 CLSI guideline[25]에 *B. cereus* 항생제 감수성기준이 설정되어 있지 않아 *S. aureus* 항생제 감수성기준을 적용 판단하였다. *B. cereus*와 *S. aureus*는 대표적인 그람양성 식중독균으로 *B. cereus*의 항생제 감수성 판정은 *S. aureus* 항생제 감수성기준을 적용 보고하고 있다[15,22]. 항생제 감수성 실험결과 gentamycin, ciprofloxacin, tetracycline, vancomycin에 감수성을 나타내었으며, oxacillin, penicillin 등 β-lactam계 항생제에 내성을 나타내었다. 이러한 결과는 보육시설 실내 환경과 식품 및 환자 가검물에서 분리한 *B. cereus*가 penicillin 항생제에 내성을 나타내었다는 보고와[15,22] *B. cereus*가 β-lactam계 항생제에 내성을 나타낸다는 보고와[26,27] 일치하는 결과로서 *B. cereus*가 β-lactamase를 생산 penicillin, oxacillin 등 β-lactam계 항생제를 분해하기 때문인 것으로 판단된다[11,20].

Acknowledgement

이 논문은 2016년 순천대학교 학술연구비로 연구되었기에 지원에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 약수와 약수터 음용도구의 일반세균수, 대장균군수 및 식중독세균 오염도를 평가하여 약수와 음용도구의 미생물학적 안전성을 평가하고자 하였다. 약수터 10곳의 약수와 약수터에 비치되어 있는 음용도구 34건을 실험대상으로 하였다. 약수의 경우 일반세균수는 평균 1.8 log CFU/mL 검출되었고 음용도구의 경우 평균 4.7 log CFU/100 cm^2 검출되었다. 위생지표미생물인 대장균군의 경우 약수는 평균 1.2 log CFU/mL 검출되었고 음용도구는 평균 1.7 log CFU/100 cm^2 검출되었다. *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*를 실험한 결과 약수와 음용

Table 4. Antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from drinking cup in spring

Antimicrobial agent	*Bacillus cereus*				
	Drinking cup-32	Drinking cup-52	Drinking cup-103	Drinking cup-104	Drinking cup-105
Gentamicin	S[1]	S	S	S	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S
Trimethoprim /sulfamethoxazole	R[2]	R	R	R	R
Tetracycline	S	S	S	S	S
Benzylpenicillin	R	R	R	R	R
Rifampin	S	R	R	S	S
Erythromycin	S	S	S	S	S
Clindamycin	S	I[3]	S	S	S
Oxacillin	R	R	R	R	R
Vancomycin	S	S	S	S	S

[1]S: Susceptibility.
[2]R: Resistance.
[3]I: Intermediate.

도구에서 *Y. enterocolitica* 등 6종의 식중독 미생물은 검출되지 않았으나, *B. cereus*는 음용 도구 34건 중 5건 (14.7%) 검출되었다. 약수터 음용도구에서 분리된 *B. cereus*의 주요 설사독소 유전자는 *nheA*와 *entFM*로 나타났다. *B. cereus* 5균주는 모두 NHE 설사 독소를 생산하였으나 HBL은 2균주에서만 검출되었다. 항생제 감수성 실험결과 oxacillin 등 β-lactam계 항생제에 내성을 나타내었다. 약수터 음용도구의 미생물 오염도와 분리된 *B. cereus*의 독소 유전자 및 독소 단백질 생산능을 분석한 결과 약수터에 비치된 음용도구에 의한 식중독 위험성이 상존하는 것으로 나타났다. 따라서 다중이 사용하는 약수터 음용도구의 철저한 위생관리가 필요하며 위생관리가 곤란할 경우 개인 컵을 이용하거나 미생물 안전성을 확보할 수 있는 음용도구 개발이 필요한 것으로 판단되었다.

References

1. Kim H.S., Kim I.S., Yun C.J., Park C.K.: A study of the water quality of some natural mineral springs in Busan area. *J. of Korean Society of Environmental Engineers*. **24**(5), 939-953 (2002).
2. Kim J.A., Lee B.O., Kim O.M., Hur M.J., Kim K.T., Ro J.I., Choe C.S., Go J.M., Kim Y.H.: A study on pollution of spring in Incheon area. *Korean J. Sanitation.* **22**(3), 35-50 (2007).
3. Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I., Isobe M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* vacuole formation in Hep-2 cells. *FEMS Microbiol Lett*., **121**, 31-34 (1994).
4. Schoeni J.L., Wong A.C.L.: *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot*., **68**, 636-648 (2005).
5. Oh M.H., Ham J.S., Cox J.M.: Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol.,* **152**, 1-8 (2012).
6. Lund T., De Buyser M.L., Granum P.E.: A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol.,* **38**, 254-261 (2000).
7. Lee Y.G., Park O.H., An S.S., Kim Y.H., Kim J.M., Bae S.J., Paik K.J., Moon Y.W.: Quality of spring water influenced by rainfall in Mudeung mountain. *J. of the Korean Society for Environmental Analysis*. **14**(3), 146-157 (2011).
8. Song H.B., Kim N.Y., Jeong D.S., Lee Y.J., Jeon H.S., Kim Y.H., Jang U.S., Kim J.E.: Water Quality and influencing factors at Dalbi spring in Daegu. *J. of Korean Society of Environmental Engineers*. **25**(12), 1570-1577 (2003).
9. Han H.J., An M.J., Kim J.H.: Characteristics on *Yersinia* spp. from spring water in Seoul on recent 5 years. *J. Fd. Hyg. Safety.* **13**(4), 412-418 (1998).
10. Cheon Y.P., Shin I.H., Ahn K.S., Lee C.S., Jeong Y.J., Choi N.C.: Environmental contamination realities and geochemical characteristics for groundwater in Kwangju City. *J. of Korean Earth Sci. Society.* **20**(3), 266-276 (1999)
11. An S.S., Kang Y.J., Wi H., Kim J.M., Lee Y.G., Park O.H., Park J.T., Paik K.J.: Distribution of mineral contents in potable ground-water of Gwangju city. *J. of the Korean Society for Environmental Analysis*. **12**(3), 185-191 (2009).
12. Korea Food and Drug Administration: Food Code of Korea, Seoul, Korea. (2016).
13. Jeong Y.K., Seong Y.R., Cho K.S., Seong H.K. Kim J.B.: Bacteriological contamination of home toothbrushes and hygiene improvement. *J. Korean Acad. Dent. Health*, **16**(1), 15-17 (1992).
14. 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).
15. 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).
16. 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).
17. Lee H., 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).
18. Harrigan W.F., McCance M.E.: The examination of food processing plant. In Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London, UK. pp. 231-236 (1976).
19. 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).
20. Kim J.B., Kim N.Y., Kang S.H., Do Y.S., Eom M.N., Yoon M.H., Lee J.B.: Prevalence and toxin characteristics of microorganism on hand towels using for children in child care center. *J. Fd. Hyg. safety*, **28**(2), 128-145 (2013).
21. Kim J.S., Kim J.B.: Prevalence and toxin genes of foodborne pathogens isolated from toothbrush in child care center. *J. Fd. Hyg. safety*, **30**(3), 242-248 (2015).
22. Kim J.B., Kim J.M., Cho S.H., Oh H.S., Choi N.J., 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).
23. 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).
24. Kim J.B., Park J.S., Kim M.S., Hong S.C., Park J.H., Oh D.H.: Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **150**(1), 66-72 (2011).
25. Clinical and Laboratory Standards Inst.: Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. Wayne,

Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Inst. pp. 16 (2006).
26. Lee K.H., Lyu E.S., 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).
27. Dinges M.M., Orwin P.M., Schli evert P.M.: Exotoxins of S*taphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. rev.*, **13**(1), 16-34 (2000).