pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 5, pp. 356~360 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.5.356

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

Bacillus subtilis, *Geobacillus stearothermophilus* 및 *Bacillus atrophaeus* 포자의 열 저항성 비교

정은선 · 남주희 · 김중범*
순천대학교 식품공학과

Comparison of Heat Resistance of *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, and *Bacillus atrophaeus* spores

Eun-Sun Jeong, Ju-Hee Nam, Jung-Beom Kim*
Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon, Korea

(Received September 9, 2023/Revised September 24, 2023/Accepted October 6, 2023)

ABSTRACT - We analyzed the heat resistance of non-pathogenic *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, and *Geobacillus stearothermophilus* spores which exhibit strong heat resistance and evaluated the possibility of using them to determine direct sterilization when manufacturing retort foods. The D_{121}-values of *B. subtilis*, *G. stearothermophilus*, and *B. atrophaeus* spores were 2.9±0.1 min, 4.3±0.1 min, and 3.7±0.1 min, respectively. The Z-values of *B. subtilis*, *G. stearothermophilus*, and *B. atrophaeus* spores were 43.0±1.4°C, 25.0±1.6°C, and 35.8±1.4°C, respectively. The D_{121}-values of *B. subtilis*, *G. stearothermophilus*, and *B. atrophaeus* spores were all higher than that of *Clostridium botulinum* spores used to confirm retort food sterilization. Considering these results, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus*, and *B. atrophaeus* spores can be used instead of the pathogenic spore-forming bacteria *C. botulinum* when sterilizing retort food. In addition, sterilization can be confirmed in 2 to 3 days, a shorter time than the 13 days required for existing bacterial growth experiments based on the Korean food code.

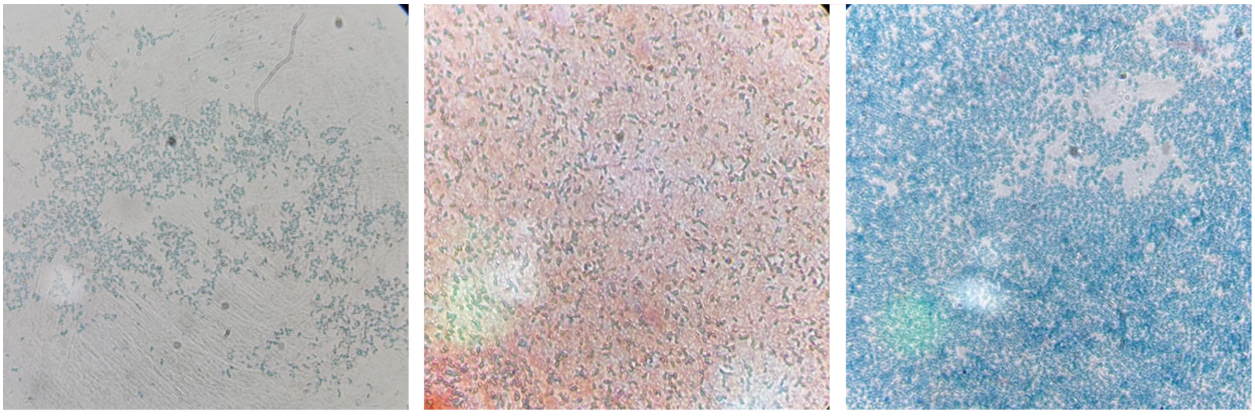
Key words: Heat resistance, Spore, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*

1인 가구의 증가에 따라 간단한 조리 후 바로 섭취할 수 있는 가정간편식(home meal replacement, HMR)의 소비가 증가하고 있다[1]. 가정간편식에는 냉동제품, 즉석밥, 레토르트 식품 등이 있으며, 레토르트 식품의 생산액은 2014년 약 7,000억 원에서 2022년 약 1조 7천만 원으로 꾸준히 증가하는 추세이다[2,3]. 레토르트 식품은 식품을 장기간 실온에서 유통하고자 플라스틱 필름이나 금속박을 여러 층으로 접착한 후 파우치 형태로의 용기에 충전·밀봉하여 멸균한 것을 지칭한다[4]. 레토르트 식품의 멸균은 제품 중심 온도가 120°C 이상에서 4분 이상 또는 동등 이상의 효력이 있는 방법으로 열처리하도록 규정하고 있다[4]. 레토르트 식품의 멸균 여부는 식품공전의 세균발육 실험 또는 *Clostridium botulinum* 포자의 멸균 여부로 확인한다[5].

멸균 여부 확인을 위한 세균발육 실험은 가온 보존과 세균실험을 실시하여야 한다. 가온 보존은 시료 5개를 포장 상태로 35-37°C 배양기에 10일간 보존한 후 상온에서 1일간 추가로 방치하여 용기의 팽창 또는 새는 것을 확인하여 양성으로 판단한다. 이후 음성인 검체를 대상으로 세균실험을 진행하여 멸균 여부를 판정한다. 따라서 세균발육 실험은 최소 13일의 장기간이 소요되는 단점이 있다[4]. 또한 레토르트 식품의 멸균 여부는 대표적 혐기성 세균인 *C. botulinum* 포자의 사멸 여부를 확인하여 단시간에 멸균 여부를 확인할 수 있다[6,7]. 그러나 병원성을 나타내는 *C. botulinum*의 취급과 보관에 어려움이 있고, 혐기성 배양에 다양한 장비가 필요하여 레토르트 식품 멸균 여부 확인에 직접 적용하기 곤란한 문제점이 있다[8]. 따라서 *C. botulinum* 포자의 멸균 여부를 직접 확인하기보다 중심 온도가 120°C 이상에서 4분 이상 또는 동등 이상의 효력이

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

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



(A) (B) (C)

Fig. 1. Microscopic photograph of *Bacillus subtilis* (A), *Geobacillus stearothermophilus* (B) *and Bacillus atrophaeus* (C) spore

있는 방법으로 가열살균하고 있다[4]. 그러나 직접적인 멸균 여부를 확인하지 못해 레토르트 식품생산 시 120°C에서 10-40분간 가열하는 등 기준을 초과하는 과도한 열처리를 하고 있어 식품의 품질 저하 및 생산단가 증가 등의 문제점을 야기하고 있다[9].

Bacillus spp.는 그람양성, 간균으로 주로 물과 토양 등 자연계에 널리 분포하는 비병원성 세균으로 생육조건에 따라 포자를 형성한다[10]. *Bacillus* spp.의 포자는 열, 화학제품 등에 대한 강한 내성을 가져 살균지표 미생물로 다양한 연구에 활용되고 있다[11,12]. 따라서 본 연구에서는 강한 내열성을 가지는 비병원성 *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* 포자의 열 저항성을 분석하여 레토르트 식품 제조 시 직접적인 멸균 여부 판정에 사용 가능성을 평가하고자 하였다.

Materials and Methods

실험 재료

본 실험에 사용된 균주는 *B. atrophaeus* (KCTC 3701, 1022), *B. subtilis* (KCTC 3135, 1027) *G. stearothermophilus* (KCTC 1752, 2107)로 생물자원센터(Korea Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다. 포자 생산 배지로는 0.005% Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_20$, Daejung chemical & metals, Siheung, Korea) 첨가 Nutrient Agar (NA, MBcell, Seoul, Korea)와 Tryptic Soy Agar (TSA, MBcell, Seoul, Korea)를 사용하였다.

포자현탁액 제조

B. atrophaeus, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* 포자는 Park 등과 Kim 등의 방법을 변형하여 현탁액을 제조하였다[13,14]. 각각 균주를 0.005% $MnSO_4 \cdot H_2O$ 첨가된 NA에 획선도말하여 *B. atrophaeus*와 *B. subtilis*는 30°C, *G. stearothermophilus*는 55°C에서 14일간 배양한 뒤 다음과 같이 포자를 수확하였다. 멸균증류수와 cell scraper를 이용하여 배양된 균을 회수한 뒤 vortex mixer (SI-0246A, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)로 혼합한 균액을 1.5 mL eppendorf tube에 1 mL씩 분주하여 12,000 ×g에서 10분간 원심분리하였다. 이후 상층액을 제거하고 멸균증류수 1 mL를 가하여 균질화한 뒤 12,000 ×g에서 10분간 원심분리하였으며, 위 과정을 3회 반복하여 회수된 포자는 4°C에서 보관하였다. 이 균액은 실험 직전에 85°C에서 30분간 열처리하여 영양세포를 사멸시킨 뒤 12,000 ×g에서 10분간 원심분리하였으며 상층액을 제거하고 멸균인산완충희석용액 1 mL를 가하여 균질화한 뒤 12,000 ×g에서 10분간 원심분리하였다. 이 세척 과정을 3회 반복하여 시험용 포자현탁액으로 사용하였다. 포자 확인을 위해 Shaeffer and Fulton stain을 이용하여 푸른색으로 염색된 포자를 현미경(NB-2000T, NeoScience Co.,Ltd., Seoul, Korea)으로 관찰하였다(Fig. 1)[15]. 회수된 포자의 최종 농도는 각각의 *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus*를 혼합하여 5-7 Log CFU/mL 수준이 되도록 희석하였다.

포자 불활성화

D-value와 Z-value 측정하기 위해 포자현탁액을 111, 116, 121°C로 조정된 oil bath (WHB-11, Daihan Sientific, Wonju, Korea)에서 열처리하였다.

생균 수 측정

열처리된 포자현탁액과 10배 계단 희석한 희석액을 시험용액으로 사용하였다. Petri dish 3장에 각각의 시험용액 1 mL를 접종한 뒤 TSA를 분주하여 *B. atrophaeus*와 *B. subtilis*는 30°C, *G. stearothermophilus*는 55°C에서 24시간 배양한 후 형성된 집락을 계수하여 평균 집락 수에 희석배수를 곱하여 생균 수로 산출하였다.

D-value 및 Z-value 산출

D-value는 각각의 온도에서 미생물의 균수를 1/10 감소시키는데 필요한 시간으로 성장곡선의 직선적 부분, 즉 1차 함수적으로 감소하는 범위에서 시간을 산출하였다[16]. 따라서 D_{121}-value는 121°C에서 각각의 미생물의 균수를 1/10로 감소시키는데 필요한 시간을 나타낸다. Z-value는 3개의 D-value를 이용하여 직선 회귀방정식을 구한 뒤 D-value가 1 log cycle 감소하는데 필요한 온도 변화를 산출하였다[16].

통계분석

실험 균주에 대해 온도 및 시간별 살균을 통해 분석한 D-value 및 Z-value를 SPSS V27 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 실험균주의 살균 특성 간 통계적 유의성을 비교하였다. 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 집단 값을 비교하였으며, $P<0.05$의 유의수준으로 Duncan 다중범위검정으로 사후검정을 실시하였다.

Results and Discussion

Bacillus spp. 포자의 열 저항성

B. subtilis 포자의 살균온도에 따른 D-value와 Z-value는 Table 1에 나타내었다. *B. subtilis* 포자의 111°C와 116°C, 121°C에서 D-value는 각각 5.0±0.1분, 4.4±0.1분, 2.9±0.1분이었으며, Z-value는 43.0±1.4°C로 나타났다. 이러한 결과는 Lee 등[17]이 보고한 부패 팥앙금에서 분리한 *B. subtilis* 포자의 121°C에서 D-value 0.69분에 비하여 높은 값을 나타냈다. *B. subtilis*는 비병원성의 포자를 형성하는 호기성균으로 병원균의 방제에 사용되며, 국내 의료폐기물 멸균분쇄시설의 표준 지표생물로 사용되고 있다[18-20].

G. stearothermophilus 포자의 살균온도에 따른 D-value와 Z-value는 Table 2에 나타내었다. *G. stearothermophilus* 포자의 111°C와 116°C, 121°C에서 D-value는 각각 10.8±0.5분, 6.6±0.1 분, 4.3±0.1분이었으며, Z-value는 25.0±1.6°C로 나타났다. Hwang 등[21]이 보고한 부패한 팥에서 분리한 *G. stearothermophilus* 포자의 121°C에서 D-value 1.69분에 비하여 높은 값을 나타내었으나, Fraiha 등[22]이 보고한 *B. stearohermophilus* 포자의 126°C에서 D-value는 4.7분이라는 보고와 유사한 결과를 나타냈다. *G. stearothermophilus*는 비병원성의 포자를 형성하는 호기성균으로, 국내 의료폐기물 증기멸균·분쇄시설의 표준 지표생물로 사용되고 있다[20,22].

B. atrophaeus 포자의 살균온도에 따른 D-value와 Z-value는 Table 3에 나타내었다. *B. atrophaeus* 포자의 111°C와 116°C, 121°C에서 D-value는 각각 7.1±0.2분, 5.2±0.1분, 3.7±0.1분이었으며, Z-value는 35.8±1.4°C로 나타났다. Kempf[23] 등이 보고한 건열에 의한 *B. atrophaeus* 포자의 125°C에서 D-value는 33.9분으로 큰 차이를 나타냈다. 이는 수분이 없는 건조한 상태에서는 열 침투속도가 감소하기 때문에 포자의 사멸에 장시간이 소요된 것으로 판단된다[24]. *B. atrophaeus*는 비병원성의 포자를 형성하는 호기성균으로 포자의 불활성화, 항균작용 등의 다양한 연구에 사용되고 있으며, 미국의 건열 및 ethylene oxide 가스 멸균법 확인을 위한 생물학적 지표로도 사용되고 있다[23,25-27].

Table 1. D-value and Z-value of *B. subtilis*

Temperature (°C)	Time (min)	Mean±SD	D-value	Z-value
111	0	7.7±0.1[1)]	5.0±0.1	43.0±1.4
	5	5.8±0.2		
	10	5.2±0.1		
	15	4.5±0.2		
116	0	7.7±0.1	4.4±0.1	
	5	5.9±0.2		
	10	5.1±0.4		
	15	4.2±0.2		
121	0	7.7±0.1	2.9±0.1	
	3	5.8±0.1		
	6	5.3±0.1		
	9	4.4±0.1		

[1)] Log CFU/mL.

Table 2. D-value and Z-value of *G. stearothermophilus*

Temperature (°C)	Time (min)	Mean±SD	D-value	Z-value
111	0	5.0±0.0[1)]	10.8±0.5	25.0±1.6
	5	4.3±0.1		
	10	3.8±0.1		
	15	3.6±0.3		
116	0	5.0±0.0	6.6±0.1	
	5	3.9±0.1		
	10	3.4±0.3		
	15	2.7±0.1		
121	0	5.0±0.0	4.3±0.1	
	3	3.9±0.2		
	6	3.6±0.1		
	9	2.8±0.1		

[1)] Log CFU/mL.

Bacillus spp. 포자의 사멸 특성 비교

*B. subtilis, G. stearothermophilus*와 *B. atrophaeus*의 D, Z-value 값을 이용하여 각각 포자의 사멸 시간을 비교하

Table 3. D-value and Z-value of *B. atrophaeus*

Temperature (°C)	Time (min)	Mean±SD	D-value	Z-value
111	0	7.0±0.0[1)]	7.1±0.2	35.8±1.4
	5	5.9±0.2		
	10	5.5±0.1		
	15	4.8±0.1		
116	0	7.0±0.0	5.2±0.1	
	5	5.9±0.2		
	10	4.9±0.4		
	15	4.1±0.2		
121	0	7.0±0.0	3.7±0.1	
	3	6.7±0.1		
	6	5.6±0.1		
	9	4.7±0.1		

[1)] Log CFU/mL.

Table 4. Comparison of heat resistance in *B. subtilis*, *G stearothermophilus* and *B. atrophaeus*

Bacteria	D_{121}-value	Z-value
Bacillus subtilis	2.9±0.1[a]	43.0±1.4 [iii]
Geobacillus stearothermophilus	4.3±0.1[c]	25.0±1.6 [i]
Bacillus atrophaeus	3.7±0.1[b]	35.8±1.4 [ii]

Different superscripts within the same column are significantly different by Duncan's multiple range test (P<0.05).

였다(Table 4). *B. atrophaeus*의 D_{121}-value는 *B. subtilis* 보다 유의적으로 높게 나타났으며, *G stearothermophilus*의 D_{121}-value는 *B. atrophaeus* 보다 유의적으로 높게 나타났다. 121°C에서 15분간 살균 시, *B. subtilis* 포자가 5.2 Log 내외, *G stearothermophilus* 포자가 3.5 Log 내외, *B. atrophaeus* 포자가 4.1 Log 내외로 감소할 것으로 판단되었다.

식품의약품안전처에 따르면 *C. botulinum* 포자를 식품의 멸균지표 미생물로 제시하고 *C. botulinum* 포자의 121.1°C에서 D-value는 0.21분, Z-value는 10°C로 보고되고 있다[5)]. 그러나 *C. botulinum*은 그람양성의 포자를 형성하는 혐기성 세균으로 식품에 오염될 경우 독소형 식중독을 유발한다[28)]. 따라서 *Clostridium botulinum* 포자의 멸균 여부를 직접 확인하기보다 중심 온도가 120°C 이상에서 4분 이상 또는 동등 이상의 효력이 있는 방법으로 살균하도록 하고 있다. 그러나 직접적인 멸균 여부를 확인하지 못해 레토르트 식품생산 시 120°C에서 10-40분간 가열하는 등 기준을 초과하는 열처리를 하고 있다[9)]. 실험 결과, *B. subtilis, G stearothermophilus*와 *B. atrophaeus* 포자의 D_{121}-value는 모두 *C. botulinum* 포자의 D_{121}-value 보다 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 레토르트 식품 멸균 시 *B. atrophaeus* 등의 실험 균주 포자현탁액을 4 log CFU/mL 이상 되도록 조제하여 함께 멸균 후 포자의 사멸 여부를 확인할 경우, 병원성 포자형성균인 *C. botulinum*을 사용함에 따라 야기 되는 위험성과 보관의 어려움을 해소할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 기존 세균발육 실험에 소요되는 13일보다 단시간인 2-3일에 멸균 여부를 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

국문요약

본 연구에서는 강한 내열성을 가지는 비병원성 *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* 포자의 열 저항성을 분석하여 레토르트 식품 제조 시 직접적인 멸균 여부 판정에 사용 가능성을 평가하고자 하였다. *B. subtilis* 포자의 D_{121}-value는 2.9±0.1분이었으며, Z-value는 43.0±1.4°C로 나타났다. *G. stearothermophilus* 포자의 D_{121}-value는 4.3±0.1분이었으며, Z-value는 25.0±1.6°C로 나타났다. *B. atrophaeus* 포자의 D_{121}-value는 3.7±0.1분이었으며, Z-value는 35.8±1.4°C로 나타났다. *B. subtilis, G stearothermophilus*와 *B. atrophaeus* 포자의 D_{121}-value는 모두 레토르트 식품 멸균 확인에 사용되는 *C. botulinum* 포자의 D_{121}-value 보다 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 레토르트 식품 멸균 시 병원성 포자형성균인 *C. botulinum* 대신 *B. subtilis*, *G. stearothermophilus*, *B. atrophaeus* 포자를 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 기존 세균발육 실험에 소요되는 13일보다 단시간인 2-3일에 멸균 여부를 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 2022년도 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원(KEITI)의 지원을 받아 "병원 규모에 최적화된 감염우려 의료폐기물 멸균기 개발"을 수행한 연구결과입니다 (No. 2021003350003).

Conflict of interest

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Eun-Sun Jeong https://orcid.org/0000-0003-3308-6632
Ju-Hee Nam https://orcid.org/0009-0009-8189-2007
Jung-Beom Kim https://orcid.org/0000-0002-0290-2687

References

1. Kim, Y.W., Trends in markets for home meal replacamnets. *Food Sci. Ind.*, **50**, 57-66 (2017).

2. Kim, T.K., Choi, H.D., Kim, Y.B., Jeon, K.H., Choi, Y.S., Home meal replacement status and technology Trends. *Food Ind. Nut.*, **22**, 1-7 (2017).
3. Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation (KAFFTC), Major statistics of food and restaurant industry in 2022, KAFFTC, Naju, Korea (2022).
4. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Food code, MFDS, Cheongju, Korea (2023).
5. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines for the recognition of equivalence in sterilization heat treatment of meat, eggs, and dairy products, MFDS, Cheongju, Korea (2018).
6. Berendsen, E.M., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H., Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiol*., **45**, 18-25 (2015).
7. Hassan, H.F., Ramaswamy, H.S., Heat resistance of *G. stearothermophilus* and *C. sporogenes* in carrot and meat alginate purees. *J. Food. Process. Preserv.*, **35**, 376-385 (2011).
8. Chung, G.T., Kang, D.H., Yoo, C.K., Choi, J.H., Seong, W.K., The first outbreak of botulism in Korea. *Korean J. Clin. Microbiol*., 160-163 (2003).
9. Lee, J.H., Song, G.C., Lee, K.T., Quality differences of retorted *Samgyetangs* as affected by F 0-value levels. *Korean J. Food Preserv.*, **23**, 848-858 (2016).
10. Coonrod, J.D., Leadley, P.J., Eickhoff, T.C., Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species. *J. Infect. Dis*., **123**, 102-105 (1971).
11. Park, W.C., Lee, M.A., Sung, I.W., Phosphorus removal from advanced wastewater treatment process using PAC. *J. Korean. Soc. Environ. Eng*., **36**, 96-102 (2014).
12. Yoon, Y.H., Nam, S.H., Joo, J.C., Ahn, H.S., Photocatalytic disinfection of indoor suspended microorganisms (*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* spore) with ultraviolet light. *JKAIS*, **15**, 1204-1210 (2014).
13. Park, L.Y., Lee, S.H., Effect of chitosan on shelf life of cooked rice contaminated artificially with *Bacillus* sp. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **36**, 1589-1595 (2007).
14. Kim, H.I., Jeon, D.H., Yoon, H.J., Kwak, I.S., Eom, M.O., Sung, J.H., Park, N.Y., Won, S.A., Bae, S.Y., Lee, Y.J., Kim, S.H., Establishing test method of sporicidal activity of commercial sterilants. *J. Food Hyg. Saf*., **24**, 312-317 (2009).
15. Schaeffer, A.B., Fulton, M.D.A., Simplified method of staining endospores. *Science*, **77**, 194 (1933).
16. Chan, S.W., Lee, S.Y., Yoon, L.Y., Kim, K.B.W.R., Lee, C.J., Kwak, J.H., Kim, M.J., Kim, D.H., Jung, S.A., Kim, H.J., Ahn, D.H., Effect of physicochemical treatment on growth inhibition of hanseniaspora uvarum Y1 from yogurt. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**, 1781-1786 (2011).
17. Lee, T.K., Roh, M.H., Identification and physiological characteristics of microorganism isolated from spoiled sweetened adzuki ann. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **35**, 1456-1460 (2006).
18. Lee, P.M., Jung, M.G., Park, J.H., Song, C.G.. Investigation of bioaerosol in Arcade-type traditional market. *KSW*, *16*, 1-7 (2021).
19. Lee, H.E., Park, H.B., Characteristics and Market Trends of Natural Plant Protection Agent. *World Agriculture*. **176**, 1-14 (2015).
20. National Institute of Environmental Research (NIER), Waste process test standards, NIER, Incheon, Korea (2023).
21. Hwang, C.S., Kim, H.H., Oh, B.C., Kim, Y.S., Shin, D.H., Identification and characteristics of microorganism isolated from spoiled red bean paste. *Food Sci. Biotechnol*., **13**, 758-761 (2004).
22. Fraiha, M., Ferraz, A.C.D.O., Biagi, J.D., Determination of thermobacteriological parameters and size of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Food Sci. Technol*., **30**, 1041-1045 (2010).
23. Kempf, M.J., Schubert, W.W., Beaudet, R.A., Determination of lethality rate constants and D-values for *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372) spores exposed to dry heat from 115°C to 170°C. *Astrobiology*, **8**, 1169-1182 (2008).
24. Kumars, M., Dunders, G., Morein, N., Medical Microbiology II: Sterilization, Laboratory Diagnosis and Immunological Response, 2th ed, Cambridge Stanford Books, Broken Arrow, OK, USA (2020).
25. Gibbons, H.S., Broomall, S.M., McNew, L.A., Daligault, H., Chapman, C., Bruce, D., Karavis, M., Krepps, M., McGregor, P.A., Hong, C., Park, K.H., Akmal, A., Feldman, A., Lin, J.S., Chang, W.E., Higgs, B.W., Demirev, P., Lindquist, J., Liem, A., Fochler, E., Read, T.D., Tapia, R., Johnson, S., Bishop-Lilly, K.A., Detter, C., Han, C., Sozhamannan, S., Rosenzweig, C.N., Skowronski, E.W., Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant. *PLoS One*, **6**, e17836 (2011).
26. Guo, Y., Huang, E., Yang, X., Zhang, L., Yousef, A.E., Zhong, J., Isolation and characterization of a *Bacillus atrophaeus* strain and its potential use in food preservation. *Food Control*, **60**, 511-518 (2016).
27. Food and Drug Administration (FDA), Biological Indicator (BI) Premarket Notification [510(k)] Submissions, FDA, Rockville, MD, USA (2007).
28. Hong, J.T., Treat arthritis with bee venom. *The Sci. Technol*., **2**, 46-47 (2005).