pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 3, pp. 170~175 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.3.170

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

배지 중 Manganese sulfate 농도가 *Bacillus thuringiensis*의 곤충독소 생성 시간에 미치는 영향

이로운 · 오도경 · 정은선 · 김중범*
순천대학교 식품공학과

Effect of Manganese Sulfate Concentration in Media on Production Speed of Insecticidal Crystal by *Bacillus thuringiensis*

Ro-Un Lee, Do Gyung Oh, Eun-Sun Jeong, Jung-Beom Kim*
Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon, Korea

(Received May 14, 2023/Revised June 3, 2023/Accepted June 12, 2023)

ABSTRACT - In this study, the effect of $MnSO_4$ on the insecticidal crystal (IC) produced by *Bacillus thuringiensis* for a rapid detection medium was analyzed. The strains used included one *B. thuringiensis* reference (KCTC 1511) and nine wild-type strains. The IC in *B. thuringiensis* was detected following the method published by the Ministry of Food and Drug Safety in Korea. In the nutrient agar to which 0.005% $MnSO_4$ was added, IC was observed on two of the three plates after 48 hours of incubation and on all three plates after 120 hours. In AK agar, IC was observed on one and two of the three plates after 48 and 96 hours of incubation, respectively. These results indicated that 0.005% $MnSO_4$ nutrient agar is more appropriate than AK agar for production of IC in *B. thuringiensis.* The effect of various $MnSO_4$ concentrations on IC production was studied after 24 hours of incubation. IC was produced on 1 of the 10 plates with 0.000% $MnSO_4$ nutrient agar, 2 of the 10 plates with 0.001% $MnSO_4$ nutrient agar, and 3 of the 10 plates with 0.002% $MnSO_4$ nutrient agar. IC was not observed for the other nutrient agars containing 0.003%–0.009% $MnSO_4$. These results indicated that nutrient agar with 0.002% $MnSO_4$ led to the most rapid production of IC by *B. thuringiensis* after 24 hours of incubation. However, the conditions for IC production by *B. thuringiensis* depended on the incubation conditions and strain activity. Therefore, further studies are needed to verify the effects of 0.002% $MnSO_4$ on the production of IC by various *Bacillus thuringiensis* strains.

Key words: Manganese sulfate, Production time, Insecticidal crystal, *Bacillus thuringiensis*

Bacillus cereus 그룹은 *Bacillus cereus, Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bailllus weihenstephanensuis* 6개로 구분[1] 되며 세균의 형태학적 특성과 생화학적 특성이 거의 유사하여 동일 그룹으로 분류된다. *B. cereus* 그룹 중 *B. cereus*와 *B. myoides, B. anthracis* 등은 16S rRNA의 유사도가 매우 높지만 운동성과 용혈성 차이로 구별이 가능하다[2]. 그러나 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*의 표현형과 유전형이 매우 유사하여 생화학적 분석과 유전학적으로 구분되지 않는다[3].

*B. cereus*는 토양, 하수 등 자연계에 널리 분포하는 그람양성의 호기성 세균으로, 생성된 포자는 내열성이 강하며 135°C의 고온에서도 사멸하지 않고, 주모성 편모를 가지고 있어 운동성을 나타낸다. *B. cereus*는 식중독을 일으키는 대표적인 병원성균으로 증상은 설사형(diarrhoeal disease)과 구토형(emetic disease)으로 구분된다[2]. 설사형은 *B. cereus*균의 영양세포 또는 포자를 섭취하여 인체의 장내에서 설사형 독소(enterotoxin)를 생성한다. 8-16시간의 잠복기를 가지며, 향신료를 첨가한 요리, 육류, 샐러드, 바닐라 소스 및 소시지 등의 식품 섭취 후 발병한다. 주요 증상은 수인성 설사, 어지러움, 복통 등의 증상이 나타난다.

*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.

구토형은 *B. cereus*균이 생산한 구토 독소(cereulide)에 의해 발생한다. 1-5시간의 잠복기를 가지며, 주로 쌀밥이나 쌀을 이용한 볶음밥 등 탄수화물 식품 및 전분질이 많은 파스타 등의 식품이 주요 원인으로 보고되고 있다. 주요 증상은 메스꺼움과 구토, 위경련 등의 증상이 보고되고 있다[3-5].

*B. thuringiensis*는 곤충에 대해 강한 독성을 가지는 살충 단백질을 생성하여 곤충에 의한 식물 피해를 억제하는 미생물 농약 세균으로 사용되고 있다[6]. 시중에 유통되고 있는 친환경 농약제재인 토박이는 *B. thuringiensis*를 이용한 친환경 농약제재이다[7]. *B. thuringiensis*는 죽은 누에로부터 처음 분리 동정된 후 누에 사육장, 토양, 연못, 곤충의 사체, 저장작물 그리고 식물체의 잎 표면 등에서 분리되고 있다[8]. 이러한 보고로 보아 *B. thuringiensis*는 자연계에 널리 분포하고 있으며, 다양한 식물재배에 미생물 농약으로 사용되고 있다.

B. cereus 식중독의 주요 원인 식품으로 즉석섭취식품 등이 보고되고 있으며, 과채 음료 등에서도 *B. cereus*가 검출되어 식품위생 상 문제점으로 대두되고 있다[4,9]. 그러나 과채 음료의 주원료인 유기농 양배추와 케일 등의 재배 시 화학농약을 사용하지 않고 *B. thuringiensis* 등의 미생물 농약을 사용하고 있다[10]. 미생물 농약으로 사용되는 *B. thuringiensis*가 식품에 잔존한 후 식중독 세균인 *B. cereus*로 잘못 동정되어 문제를 야기하고 있다[11]. 따라서 식중독 원인균인 *B. cereus*와 미생물 농약 세균인 *B. thuringiensis*를 구분할 필요성이 있다.

현재까지 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 구분하기 위한 실험법은 식품의약품안전처에서 제시한 실험방법으로 *B. thuringiensis*가 생산한 곤충독소(Insecticidal crystal)를 24시간 배양 후 염색하여 확인하거나, 24시간 배양 후에도 곤충독소가 확인되지 않을 경우, 계속 배양하여 곤충독소를 확인하도록 규정하고 있어 실험에 장시간이 소요된다는 단점이 있다. 또한 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 구분하는 실험법으로 PCR (polymerase chain reaction) 방법이 보고되고 있으나, 곤충독소를 생산하는 *cry* 유전자가 다수가 보고되고 PCR 방법으로 3-5개 이상의 *cry* 유전자를 동시에 검출하기 곤란하여 PCR 방법의 정확도를 100% 확보하기 곤란한 단점이 있다[12].

따라서 본 연구에서는 $MnSO_4$이 *B. thuringiensis*의 곤충독소 형성에 미치는 영향을 분석하여 *B. thuringiensis* 신속 검출배지 제조의 기초자료를 제공하고자 하였다.

Materials and Methods

실험균주

본 실험에 사용한 균주는 순천대학교 식품위생안전실험실에 보관되어 있던 *B. thuringiensis* reference 균주 1주(KCTC 1511)와 식품에서 분리된 wild type strain 균주 9주를 사용하였으며, 사용 균주 목록은 Table 1에 나타내었다. 보관 균주는 Tryptic soy broth (TSB, MB cell, Seoul, Korea)에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 동일방법으로 2회 계대배양하여 실험 균액으로 사용하였다[13].

Table 1. *Bacillus thuriengiensis* strains used in this study

Number	Strain
1	Reference strain KCTC 1511
2	Wild type strain 1438-2
3	Wild type strain 1421-S1
4	Wild type strain 1434-S2
5	Wild type strain 1431-S3
6	Wild type strain 1433-S1
7	Wild type strain 1431-S4
8	Wild type strain 1431-S5
9	Wild type strain 1431-S2
10	Wild type strain 1432-S1

배지 제조

Nutrient agar (MB cell, Seoul, Korea)에 $MnSO_4$ (Daejung Chemicals & Metals, Siheung, Korea)의 농도를 0.000%-0.009%로 달리하여 첨가한 후 제조사가 제시하는 방법으로 배지를 제조하였다. 포자형성 배지로 사용되는 AK agar (0.3%-$MnSO_4$; BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 또한 제조사가 제시하는 방법에 따라 제조하여 실험에 사용하였다.

균주 배양

실험 균액 한 백금이를 취하여 $MnSO_4$ 농도를 달리한 Nutrient agar (MB cell, Seoul, Korea)와 AK agar (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 획선 도말하였다. 도말된 배지를 35°C에 24시간, 48시간, 72시간 배양한 후 한 개 집락을 선택하여 곤충독소 염색에 사용하였다.

곤충독소 염색 및 현미경 관찰

*B. thuriengiensis*의 곤충독소 생성 유무를 확인하기 위하여 식품의약품안전처의 곤충독소 확인시험법에 따라 실험하였다[12]. 실험방법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 슬라이드글라스에 증류수를 떨어뜨리고 배양된 균을 현탁하여 공기 중에서 건조 후 슬라이드글라스를 알코올램프 불꽃에 통과시키면서 약하게 가열하여 균주를 고정시켰다. 균주를 고정시킨 후 슬라이드글라스를 Methanol (J.T.Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA)에 30초간 침지하였다. 침지 후 슬라이드글라스를 꺼내어 공기 중에서 건조하였다. 건조 후 슬라이드글라스를 0.5% Basic fuchsin이 첨가된 Glass staining jar에 침지하여 30초간 방치하였다. 염색된

슬라이드글라스를 꺼내어 알코올램프 불꽃에 약하게 가열한 후 증류수로 세척하였다. 이 과정을 2회 반복하여 현미경 검경에 사용하였다. 염색된 슬라이드글라스에 Immersion oil을 점적한 후 광학현미경(NB-2000T, Mightex, Tronto, Canada)을 이용하여 1000배로 확대한 후 곤충독소의 생성 유무를 관찰하였다.

Results and Discussion

Nutrient agar와 AK agar의 곤충독소 생성능 비교

*B. thuringiensis*를 0.005%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar와 AK agar에 배양한 후 곤충독소 생성 유무를 관찰하였으며 그 결과를 Figs. 1-3에 나타내었다. 0.005%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar는 배양 48시간에 3개 평판 중 2개 평판(66.6%)에서 곤충독소가 관찰되었고, 120시간에 3개 평판(100%) 모두에서 곤충독소가 관찰되었다. AK agar는 48시간 배양 후 3개 평판 중 1개 평판(33.3%)에서 곤충독소가 관찰되었으며, 120시간 배양 후 3개 평판(100%) 모두에서 곤충독소가 관찰되었다.

*B. thuringiensis*의 곤충독소는 포자형성과 동시에 생성된다고 보고되고 있다[14,15]. 따라서 *B. thuringiensis*의 포자가 신속하게 생성된다면 *B. thuringiensis*의 곤충독소도 신

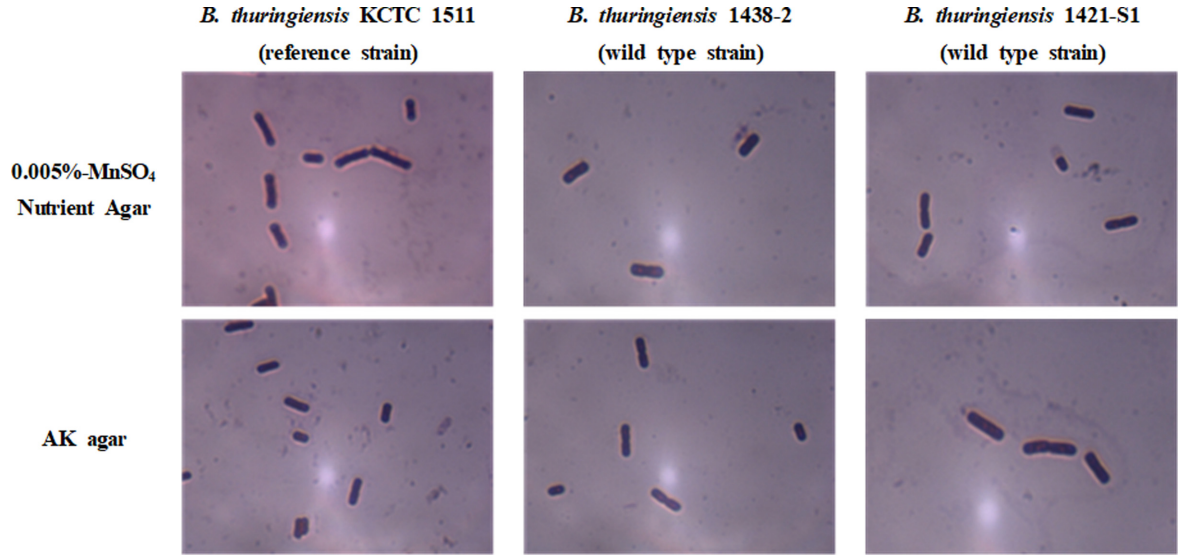

Fig. 1. Comparison of insecticidal crystal production in *B. thuringiensis* between 0.005%-$MnSO_4$ nutrient agar and AK agar cultured at 35°C for 24 hours

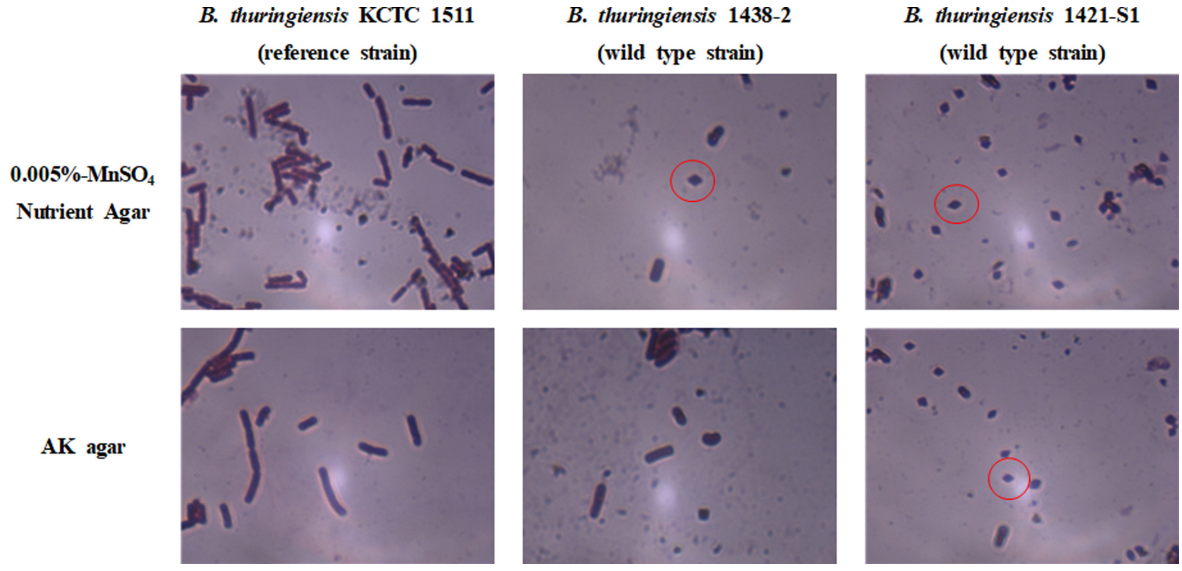

Fig. 2. Comparison of insecticidal crystal production in *B. thuringiensis* between 0.005%-$MnSO_4$ nutrient agar and AK agar cultured at 35°C for 48 hours

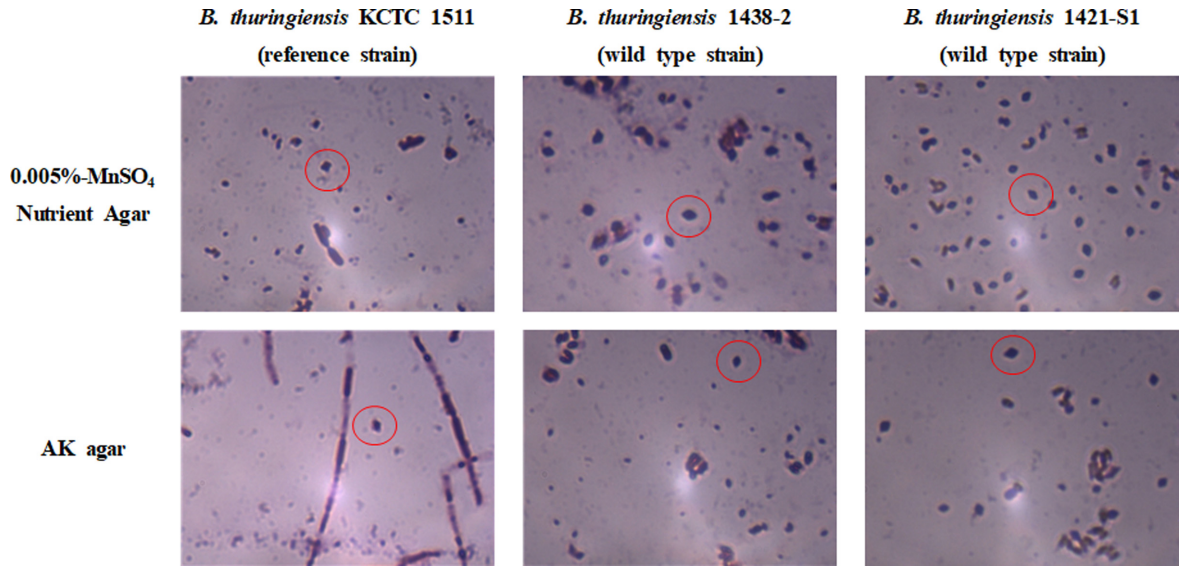

Fig. 3. Comparison of insecticidal crystal production in *B. thuringiensis* between 0.005%-$MnSO_4$ nutrient agar and AK agar cultured at 35°C for 120 hours

속하게 생성될 수 있다고 판단된다. AK agar는 우유 및 유제품에서 항생제 잔류물질 검출을 위한 포자 배양 배지로 사용되고 있다. 펩톤과 쇠고기 추출물은 질소, 황, 아미노산 및 필수 미량 성분의 공급원으로 사용되며, 효모 추출물은 비타민 B의 공급원으로 사용되고, 포도당은 박테리아 복제를 위한 에너지원으로 사용된다. 특히 $MnSO_4$는 포자형성 과정에서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다[16,17]. 또한 식품공전 시험법[18]에 고시된 포자 조제용 방법은 Nutrient agar에 0.005%-$MnSO_4$ 첨가된 배지를 실험에 사용하도록 규정하고 있다. 따라서 본 연구에서는 AK agar와 0.005%-$MnSO_4$ 첨가된 Nutrient agar를 *B. thuringiensis*의 곤충독소 생성 배지로 선정하였다. 본 연구에서 총 3개의 *B. thuringiensis* 균주를 0.005%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar와 AK agar(0.3%-$MnSO_4$)에서 배양하여 곤충독소 생성 능력을 비교한 결과 AK agar보다 0.005%-$MnSO_4$ 첨가된 Nutrient agar에서 *B. thuringiensis*의 곤충독소가 신속하게 생성되었다. 이러한 결과는 AK agar보다 식품공전에서 제시하고 있는 포자형성 배지인 0.005%-$MnSO_4$ Nutrient agar가 *B. thuringiensis*의 곤충독소를 신속하게 검출하는 것으로 판단되었다.

황산망간 농도가 곤충독소 생성에 미치는 영향

농도별로 $MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar에서 *B. thuringiensis*의 곤충독소 생성률은 Table 2에 나타내었다. *B. thuringiensis* 10개 균주를 24시간 배양하여 관찰한 결과, 0.000%-$MnSO_4$ 배지에서 10개 평판 중 1개 평판(10%), 0.001%-$MnSO_4$이 첨가된 배지의 10개 평판 중 2개 평판(20%)에서 곤충독소가 관찰되었다. 0.002%-$MnSO_4$이 첨가된 배지는 10개 평판 중 3개 평판(30%)에서 곤충독소가 관찰되었다. 0.003%-0.009%-$MnSO_4$이 첨가된 배지에서는 곤충독소가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 보아 24시간 배양 시까지는 0.002%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar가 *B. thuringiensis*의 곤충독소를 가장 신속하게 생성시키는 것으로 나타났다.

B. thuringiensis 10개 균주를 48시간 배양하여 관찰한 결과, 0.000%-$MnSO_4$ 배지와 0.001%-0.003%-$MnSO_4$이 첨가된 배지는 각각 10개 평판 중 5개 평판(50%)에서 곤충독소가 관찰되었다. 또한 0.004%-$MnSO_4$이 첨가된 배지에서는 10개 평판 중 4개 평판(40%), 0.005%-0.009%-$MnSO_4$이 첨가된 배지는 각각 10개 평판 중 3개 평판(30%)에서 곤충독소가 관찰되었다. 이러한 결과로 보아 48시간 배양

Table 2. Comparison of insecticidal crystal production in *B. thuringiensis* according to the $MnSO_4$ concentration

Incubation time	$MnSO_4$ concentration in Nutrient agar(%)									
	0.000	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009
24 hours	10%	10%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
48 hours	50%	50%	50%	50%	40%	30%	30%	30%	30%	30%
72 hours	50%	50%	50%	50%	50%	50%	40%	30%	30%	30%

시까지는 0.000%-$MnSO_4$ 배지와 0.001%-0.003%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar가 *B. thuringiensis*의 곤충독소를 가장 신속하게 생성시키는 것으로 나타났다.

B. thuringiensis 10개 균주를 72시간 배양하여 관찰한 결과, 0.000%-$MnSO_4$ 배지와 0.001%-0.005%-$MnSO_4$이 첨가된 배지는 10개 평판 중 각각 5개 평판(50%)에서 곤충독소가 관찰되었다. 0.006%-$MnSO_4$이 첨가된 배지는 10개 평판 중 4개 평판(40%), 0.007%-0.009%-$MnSO_4$이 첨가된 배지는 10개 평판 중 각각 3개 평판(30%)에서 곤충독소가 관찰되었다.

*B. thuringiensis*의 곤충독소는 포자형성과 동시에 생성된다는 보고[14,15]와 $MnSO_4$이 포자형성에 기여한다는 보고[16,17]를 종합하여 보면, $MnSO_4$이 *B. thuringiensis*의 포자형성을 가속화하고 이로 인해 곤충독소도 신속하게 생성된 것으로 판단된다. 따라서 *B. thuringiensis*의 곤충독소를 신속하게 생성하기 위해 기존 식품공전에서 제시하고 있는 Nutrient agar보다 0.002%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar를 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단된다. 그러나 Nutrient agar와 0.002%-$MnSO_4$ Nutrient agar의 24시간 배양 후 곤충독소 생성율의 차이는 작게 나타나 다수의 wild type *B. thuringiensis*를 대상으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

국문요약

본 연구에서는 $MnSO_4$이 *B. thuringiensis*의 곤충독소 형성에 미치는 영향을 분석하여 신속 검출배지 개발의 기초자료를 제안하고자 하였다. 본 실험에 사용한 균주는 순천대학교 식품위생안전실험실에 보관되어 있던 *B. thuringiensis* reference 1주(KCTC 1511)와 식품에서 분리된 wild type strain 9주를 사용하였다. *B. thuriengiensis*의 곤충독소 생성 확인은 식품의약품안전처의 곤충독소 확인 시험법에 따라 실험하였다. 0.005%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar는 배양 48시간에 3개 평판 중 2개 평판(66.6%)에서 곤충독소가 관찰되었고, 120시간에 3개 평판(100%) 모두에서 곤충독소가 관찰되었다. AK agar는 48시간 배양 후 3개 평판 중 1개 평판(33.3%)에서 곤충독소가 관찰되었으며, 배양 120시간에 3개 평판(100%) 모두에서 곤충독소가 관찰되었다. 이러한 결과는 포자형성에 사용되는 AK agar보다 식품공전에서 제시하고 있는 포자형성 배지인 0.005%-$MnSO_4$ Nutrient agar가 *B. thuringiensis*의 곤충독소를 신속하게 생성시키는 것으로 나타났다. *B. thuringiensis* 10개 균주를 24시간 배양하여 관찰한 결과, 0.000%-$MnSO_4$ 배지에서 10개 평판 중 1개 평판(10%), 0.001%-$MnSO_4$이 첨가된 배지의 10개 평판 중 2개 평판(20%)에서 곤충독소가 관찰되었다. 0.002%-$MnSO_4$이 첨가된 배지는 10개 평판 중 3개 평판(30%)에서 곤충독소가 관찰되었다. 0.003%-0.009%-$MnSO_4$이 첨가된 배지에서는 곤충독소가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 보아 24시간 배양 시까지는 0.002%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar가 *B. thuringiensis*의 곤충독소를 가장 신속하게 생성시키는 것으로 나타났다. *B. thuringiensis*의 곤충독소는 포자형성과 동시에 생성된다는 보고와 $MnSO_4$이 포자형성에 기여한다는 보고를 종합하여 보면, $MnSO_4$이 *B. thuringiensis*의 포자형성을 가속화하고 이로 인해 곤충독소도 신속하게 생성된 것으로 판단된다. 따라서 *B. thuringiensis*의 곤충독소를 신속하게 생성하기 위해 기존 식품공전에서 제시하고 있는 Nutrient agar보다 0.002%-$MnSO_4$이 첨가된 Nutrient agar를 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단된다. 그러나 Nutrient agar와 0.002%-$MnSO_4$ Nutrient agar의 24시간 배양 후 곤충독소 생성율의 차이는 작게 나타나 다수의 wild type *B. thuringiensis*를 대상으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Ro-Un Lee https://orcid.org/0009-0003-5054-409X
Do-Gyung Oh https://orcid.org/0000-0002-9753-2534
Eun-Sun Jeong https://orcid.org/0000-0003-3308-6632
Jung-Beom Kim https://orcid.org/0000-0002-0290-2687

References

1. Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S., Ravel, J., Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms, *Microbiol. Rev.*, **29**, 303–329 (2005).
2. Kim, M.G., Choi, J.C., Biotoxins involved in foodborne disease and their control enterotoxins and emetic toxin of *B. cereus*, *Food Sci. Ind.*, **42**, 2-9 (2009).
3. Koo, M.S., *Bacillus cereus* : An ambusher of food safety, *Bull. Food Tec.*, **22**, 587-600 (2009).
4. Kim, T.S., Km, M.J., Kang, Y.M., Oh, G.N., Choi, S.Y., Oh, M.S., Yang, Y.S., Seo, J.M., Ryu, M.G., Kim, E.S., Ha, D.R., Cho, B.S., Molecular characterization and toxin profile of *Bacillus cereus* strains isolated from ready-to-eat foods, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **46**, 334-340 (2014).
5. Ministry of Food and Drugs Safety, (2022, November 26). Guidelines for examination of the cause of food poisoning in 13 years. Retrieved from, https://www.mfds.go.kr/brd/m_218/view.do?seq=15126&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=49
6. Kim, H.S., Roh, J.Y., Lee, D.W., Chang, J.H., Je, Y.H., Woo, S.D., Kim, J.K., Yu, Y.M., Kang, S.K., Formulation of a new

Bacillus thuringiensis strain NT0423, *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 358-364 (1998).
7. Park, K.S., Development of biopesticide and role of *Bacillus* spp., *KIC News*, **14**, 1-11 (2011).
8. Kil, M.R., Kim, D.A., Choi, S.Y., Paek, S.K., Kim, J.S., Jin, D.Y., Hwang, I.C., Yu, Y.M., Characterization of biopesticides(*Bacillus thuringiensis*) produced in Korea, *Korean J. Pes. Sci.*, **11**, 201-209 (2007).
9. Ministry of Food and Drug Safety,(2022, November 14). Report on risk assessment of food poisoning bacteria in instant foods (2). Retrieved from, https://www.nifds.go.kr/brd/m_271/view.do?seq=12558
10. Kim, K.S., Kim, H., Park, Y.U., Kim, G.H., Kim, Y.G., An integrated biological control using an endoparasitoid wasp (*Cotesia plutellae*) and a microbial insecticide (*Bacillus thuringiensis*) against the diamondback moth, *Plutella xylostella*, *Korean J. Appl. Entomol*., **52**, 35-43 (2013).
11. Espacenet Patent search,(2022, November 23). Diagnostic primer sets for detecting *Bacillus cereus* group bacteria and diagnostic method using same. Retrieved from, https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/060943342/publication/KR20170136248A?q=pn%3DKR20170136248A
12. Ministry of Food and Drugs Safety,(2022, November 14). Insecticidal crystal protein manual. Retrieved from, https://impfood.mfds.go.kr/CFBDD06F02/getCntntsDetail?cntntsSn=288612
13. Im, J.Y., Kim, C.Y., Kim, E.Y., Kim, M.J., Kim, J.B., Effect of sterilization conditions on microbial reduction in cleaning tools, *J. Food Hyg. Saf.*, **37**, 310-316 (2022).
14. Eom, S.H., Park, Y.J., Kim, Y.G., A technique to enhance *Bacillus thuringiensis* spectrum and control efficacy using cry toxin mixture and immunosuppressant, *Korean J. Pes. Sci.*, **18**, 181-190 (2014).
15. Rural Development Administration. 2009. Agricultural microbiological field utilization manual. Section 6. supplement. Retrieved from, https://life.seocheon.go.kr/cop/bbs/BBSMSTR_000000000341/selectBoardArticle.do?nttId=B00000202340ji3hK1qu5ar8
16. Arret, B., Kirshbaum, A., A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk, *J. Milk Food Technol*., **22**, 329-331 (1959).
17. Richardson., 1985. Standard methods for the examination of dairy products, 15th ed. American Public Health Association. Washington D.C, USA
18. Ministry of Food and Drugs Safety[MFDS]. 2022. Korea food code. Article 8. General Test Methods. Retrieved from, https://foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=11193