J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 3, pp. 256~261 (2009)

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

여러 조건에 따른 *Bacillus cereus* 포자 형성과 포자의 열저항성 평가

김승주 · 정진호 · 탁홍민 · 백승엽 · 이선영*
중앙대학교 식품영양학과

Effect of Factors on the Sporulation of *Bacillus cereus* and Their Thermal Resistance

Seung-Ju Kim, Jin-Ho Jung, Hongmin Tahk, Seung-Youb Baek, and Sun-Young Lee*
Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University 72-1 Nae-ri, Daedeok-myeon, Anseong-si, Gyeonggi-do, 456-756, Korea
(Received August 6, 2009/Revised August 23, 2009/Accepted August 31, 2009)

ABSTRACT - *Bacillus cereus* is a gram-positive spore-forming bacterium and produces an emetic or diarrheal syndrome induced by an emetic toxin and an enterotoxin, respectively. In this study, the effect of different types of media, temperature, and time on the sporulation of *B. cereus*, and thermal resistance of *B. cereus* spores produced in various temperatures were evaluated. The highest levels of spores were detected when they are produced at 25°C. There were no significant differences in levels of spores produced at 25°C among culture media and times while levels of spores produced at 43°C were significantly reduced with the increase of time. However, thermal resistance of *B. cereus* spores could be affected by incubation temperature. In fact, higher D-values (12.0, 10.1, and 5.9 min for 2, 4, and 6 weeks, respectively) of spores produced at 43°C were observed than did in samples produced at other temperatures (25 and 37°C). D-values of spores were 7.7, 8.2, and 12.0 min when they were produced at 25, 37, and 43°C for 2 weeks, respectively. The sporulation of *B. cereus* at 25°C could result in high amounts of spores however the sporulation at 43°C for 2 weeks could be effective to produce thermal resistant spores.

Key words: *Bacillus cereus*, sporulation, factors, thermal resistance

*Bacillus cereus*는 Gram 양성균으로 호기성 조건에서 잘 자라지만 때때로 혐기적 환경에서도 생존하며 다양한 환경에 적응한 포자(spore)를 형성한다. 또한 식중독을 일으키는 열에 안정한 독소를 생성하여 구토 증상, 설사 증상 등 두 종류의 위장질병을 유발한다[1,3]. 구토 증상의 식중독은 peptide 독소인 emetic toxin 때문에 발병되며 cereulide라고 불리는 이 독소는 열에 안정하며 정지기(stationary phase)에 생성되고, 감염 후 1~6시간에 발병된다[4]. 반면에 설사 증상의 식중독은 지수기(exponential phase)에 생성되는 diarrhoeal toxin으로 발병되며 열에 민감하기에 56°C, 5분 열처리에 불활성화 된다[5,6].

포자는 일반 영양세포(vegetative cell) 보다 열, 화학제품, 방사선, 건조 등의 외부 스트레스에 대한 높은 내성을 가지고 있어 외부환경에서 자신을 보호한다[7]. *B. cereus*는 포자를 형성하여 토양, 공기, 물 등 자연계에서 흔히 발견되고 유제품, 향신료, 조리식품, 해산물, 채소, 식육 등 식품에 오염될 확률이 매우 높은 것으로 알려져 있다[2]. 또한 이 균은 여러 종류의 표면에 강한 접착성을 지니며 식품 가공 과정에서 stainless steel 재질 등의 표면에 부착하여 biofilm을 형성한다. 게다가 형성된 biofilm 안에 존재하는 포자는 높은 상대습도(97%나 그 이상)의 대기에 노출되면 포자의 형성을 진행시키기에 식품산업에서 많은 문제를 야기한다[8].

Berber 등 (2003)은 nutrient yeast salt medium broth에 30°C에서 5일 동안 포자를 형성하여 *Bacillus thuringiensis*와 *Bacillus sphaericus*의 구충제에 대한 포자 발화와 살충 효과 실험 하였으며[9], Leguerinel 등 (2006)은 salt를 포함한 nutrient agar에 18-55°C 범위에서 5일 동안 포자를 형성하여 열 저항성을 알아보았다[10]. 또한 stainless steel에 부착된 *B. cereus* 포자의 발아를 보기 위해 modified G medium을 사용하여 포자를 얻었다[11]. 이처럼 식품뿐만 아

*Correspondence to: Sun-Young Lee, Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, 72-1 Nae-ri, Daedeok-myeon, Anseong-si, Gyeonggi-do, 456-756, South Korea
Tel: 82-31-670-4587, Fax: 82-31-676-8741
E-mail: nina6026@gmail.com or nina6026@cau.ac.kr

니라 가공 중에 발생되는 *B. cereus* 포자에 대한 연구가 많이 진행 되어 왔지만 표준화 되지 않은 다양한 조건으로 *B. cereus*의 포자를 얻어 실험에 이용하였다.

실험실에서 이용되는 표준 균주의 내성보다 환경으로부터 분리되는 균주가 다양한 스트레스 및 저해요소에 대한 내성이 강하게 나타나는 것은 일반적인 사실이다. 즉, 자연계에서는 여러 환경적인 요인을 극복하고 자라기 때문에 저항성이 강한 포자를 형성하는데 비해, 실험실에서는 정해진 조건하에 다른 환경적 요인들은 제거해 주어 상대적으로 저항성이 약한 포자를 형성하기 때문에 포자가 형성되더라도 쉽게 생장을 저해 받는다[12,13]. 내성을 가지는 포자의 형성을 저해하기 위해서는 저항성이 자연계와 유사한 포자를 만들어 실험하는 것이 보다 효과적인 제어를 가능하게 하므로 다양한 조건하에서 스트레스에 비교적 저항성이 높은 포자를 만드는 것이 중요하다.

이에 본 연구는 가장 효과적인 포자 형성을 알아보기 위해 조건(배지, 온도, 기간)을 달리하여 포자의 형성을 비교하였으며 그때 형성된 포자의 열 저항성을 살펴보았다.

재료 및 방법

시험 균주 및 배양 조건

실험에 이용한 *B. cereus* ATCC 10876는 중앙대학교 식품영양학과 식품미생물 연구실에서 획득 하였으며 균주는 Tryptic soy broth (TSB: Difco, USA)를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 뒤에 본 실험에 사용하였다.

포자화 및 포자 관찰

TSB에서 배양한 균주의 초기 균수를 측정하고 Potato dextrose agar (PDA: Difco, USA), 0.5% NaCl이 첨가된 Nutrient agar (NA: Difco, USA), Brain heart infusion agar (BHI: Difco, USA), *Bacillus cereus* selective agar (BCSA: Oxoid, UK)에 균을 100 µl씩 접종 후 6주간 25°C, 37°C, 43°C에서 각각 배양하며 포자를 생성하게 했다. 또한 수집한 포자를 crystal violet 염색을 통해 광학현미경 (Bimeince, Model: S16C, USA)으로 포자의 생성 정도를 관찰하고 촬영하였다.

포자 수 측정

4가지 배지(PDA, NA + 0.5% NaCl, BHI, BCSA)와 3가지 온도 조건(25°C, 37°C, 43°C)에서 2, 4, 6주에 배양중인 각각의 agar plate에 멸균증류수 5 ml을 넣고 멸균된 면봉으로 plate 표면에 자란 포자를 고르게 긁어 수집하였다. 수집한 포자를 0.1 ml씩 eppendorf tube에 나눠 담아 80°C의 water bath (Chang Shin Scientific Co., Korea)에서 15분간 처리하여 발아시킨 후 발아된 균수를 TSA를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 배양하여 측정하였다.

D-value 측정

*B. cereus*를 TSB에 배양 후 초기 균수를 측정하고, 0.5% NaCl이 첨가된 Nutrient agar에 100 µl씩 골고루 도말 한 후 2, 4, 6주간 25°C, 37°C, 43°C에서 각각 배양했다. 2, 4, 6주에 배양중인 각 배지에 멸균증류수 5 ml을 넣고 멸균된 면봉으로 plate 표면에 자란 포자를 고르게 긁어 포자를 수집하여 0.25 ml씩 eppendorf tube에 나눠 담아 90°C water bath에서 3분 간격으로 21분까지 처리하였다. 열처리 후 즉시 얼음물에서 식힌 뒤 TSA를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 배양하여 측정된 균수를 통해 D-value를 구했다.

통계처리

모든 실험은 3반복으로 수행되었으며 관찰된 실험결과는 SAS 통계 프로그램(version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA)의 ANOVA procedure을 이용하여 분석되었다. 각각의 처리군이 통계적으로 유의적으로 나타나는 경우에 ($P \leq 0.05$) 각각의 3반복 실험에 의한 평균값은 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 *B. cereus*의 각 온도(25°C, 37°C, 43°C)와 배지(BCSA, BHI, NA, PDA)에서 배양기간(14일, 28일, 42일) 동안 포자 형성능력을 보여주고 있다. 25°C에서 BCSA를 제외한 모든 배지에서 시간의 경과에 따른 *B. cereus* 포자 형성 능력은 차이가 없었고, BCSA에서 14, 28일과 42일은 각각 log 9.7, log 9.4, log 11.23으로 14일에서 2주간 약 log 1.5 증가하여 유의적 차이가 있었다 ($P \leq 0.05$). 37°C에서 배양된 *B. cereus* 포자는 PDA를 제외한 모든 배지에서 시간의 경과에 따른 포자 형성 능력은 차이가 없었고, PDA에서 포자 생성은 14, 28일과 42일에서 2주간 약 log 2.1의 증가로 유의적 차이가 있었다 ($P \leq 0.05$). 43°C에

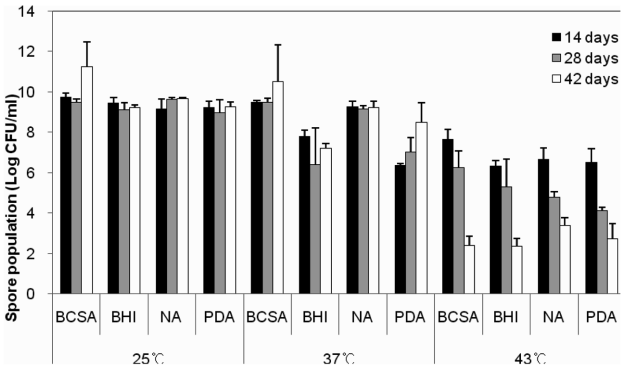

Fig. 1. Spore populations (Log_{10} CFU/ml) cultured on various types of agar media for 14 to 42 days at three different temperatures (25, 37, or 43°C).

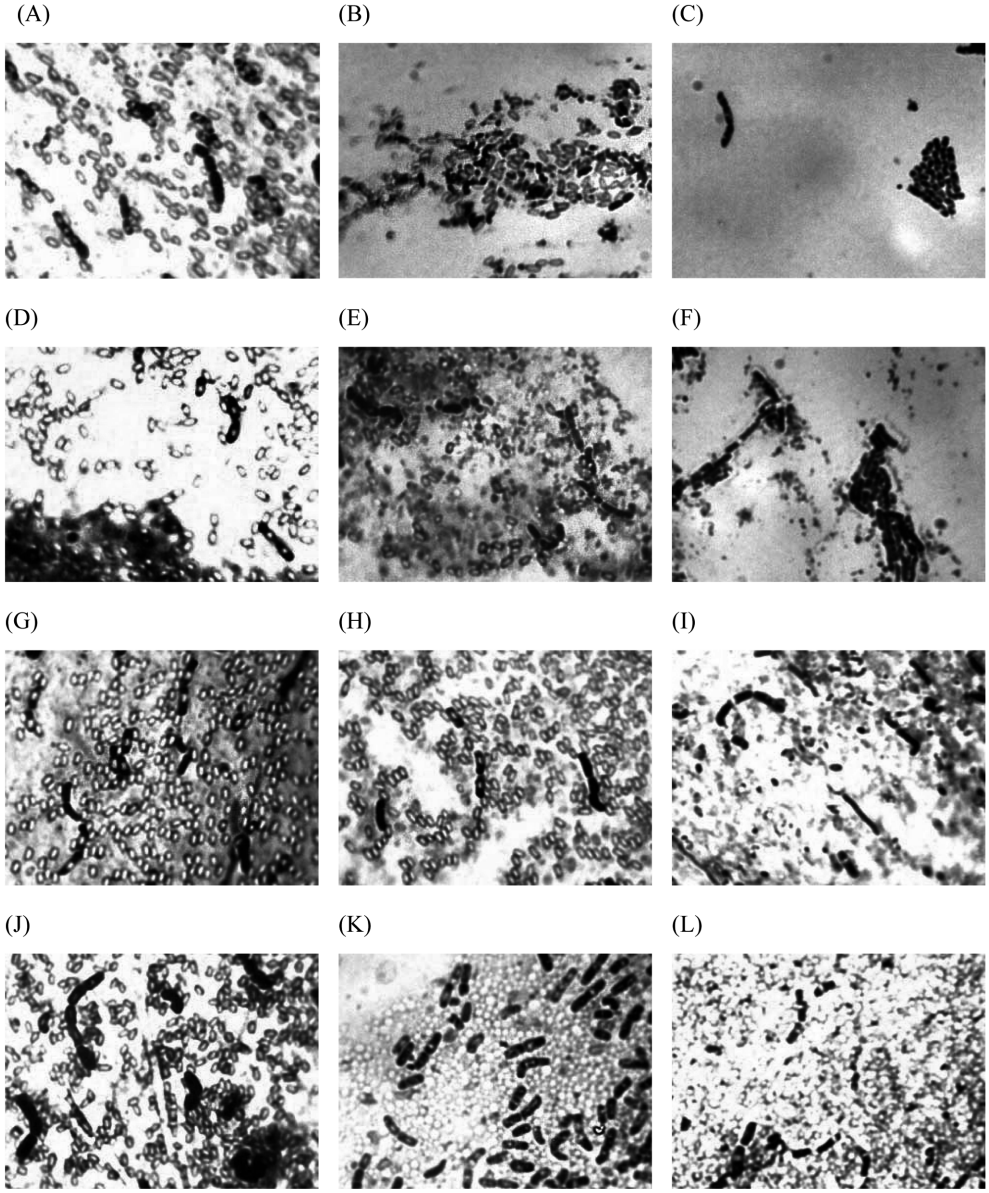

Fig. 2. Light microscope photographs of *Bacillus cereus* ATCC10876 cultured on various kinds of agar media at 25°C, 37°C, 43°C for 7days. (A) BCSA at 25°C, (B) BCSA at 37°C, (C) BCSA at 43°C, (D) BHI at 25°C, (E) BHI at 37°C, (F) BHI at 43°C, (G) NA at 25°C, (H) NA at 37°C, (I) NA at 43°C, (J) PDA at 25°C, (K) PDA at 37°C, (L) PDA at 43°C.

서 배양된 *B. cereus* 포자는 모든 배지에서 시간에 경과에 따라 포자 형성 능력이 유의적으로 감소 하였다 ($P \leq 0.05$).

배양시간에 따라 비교를 해보면 5가지 다른 배지에서 14일 동안 배양된 *B. cereus* 포자는 각각 온도 별로 유의적인 차이가 나타났고($P \leq 0.05$), 특히 BHI에서 배양하였을 때 25°C와 43°C에서 약 log 3.13의 감소를 보였다. 28일, 42일 동안 형성된 포자 또한 높은 온도 일수록 유의적으로 감소를 보였다($P \leq 0.05$). 42일 동안 배양한 포자 중 25°C, BCSA에서 약 log 11.23으로 가장 높은 포자 형성능력을 나타냈으며, 반대로 43°C, BHI에서 배양된 포자는 약 log 2.36으로 가장 낮은 포자 형성능력을 보였다. 또한 NA와 BCSA에서 전반적으로 높은 수준의 포자 형성능력이 나타났다. 결과적으로 각각 기간 동안 형성된 *B. cereus*의 포자는 배양온도가 높고, 배양기간이 길어질수록 포자 형성능력이 감소하는 경향을 보였다.

Figs. 2, 3, 4는 다양한 조건(배지, 온도, 배양시간)에서 형성된 포자와 영양세포에 대한 광학현미경 사진을 보여주고 있다. 검은색의 작은 타원은 영양세포이며 검은 테두리의 흰 타원은 형성된 포자를 나타낸다. 7일에 가장 많은 *B. cereus* 포자가 형성된 것으로 관찰되었고(Fig. 2), 배양기간이 길어 질수록 관찰되는 포자의 양이 감소하였다. 또한 Table 1의 결과와 같이 NA에서 전반적으로 많은 양

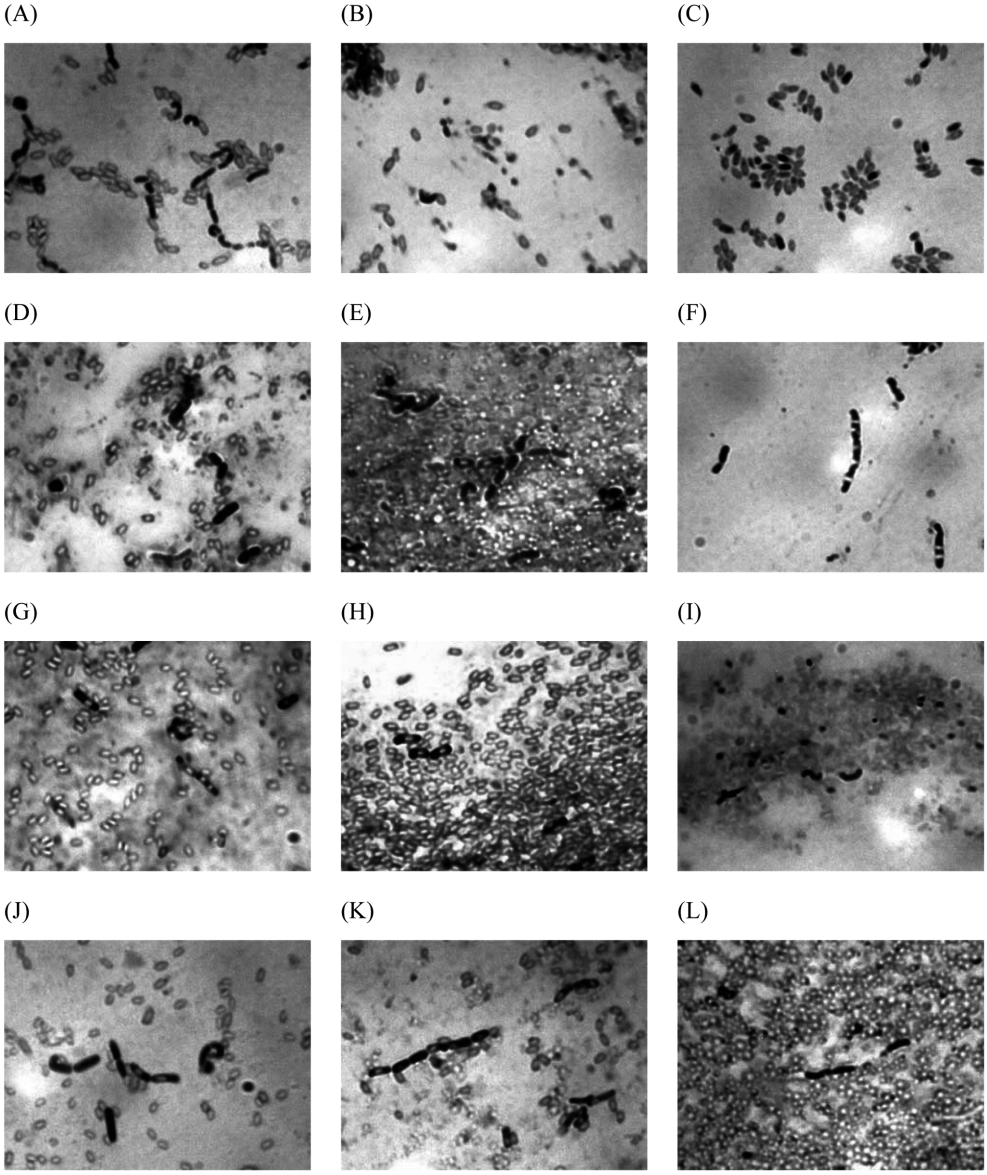

Fig. 3. Light microscope photographs of *Bacillus cereus* ATCC 10876 cultured on various kinds of agar media at 25°C, 37°C, 43°C for 14 days. (A) BCSA at 25°C, (B) BCSA at 37°C, (C) BCSA at 43°C, (D) BHI at 25°C, (E) BHI at 37°C, (F) BHI at 43°C, (G) NA at 25°C, (H) NA at 37°C, (I) NA at 43°C, (J) PDA at 25°C, (K) PDA at 37°C, (L) PDA at 43°C.

의 포자가 형성 되었음을 볼 수 있었다(Figs. 2, 3, 4).

Table 1은 본 실험에서 *B. cereus*의 각 온도(25°C, 37°C, 43°C)에서 각 배양기간(14일, 28일, 42일)동안 형성된 포자의 열 저항성 결과를 보여주고 있다. 43°C에서 배양된 포자의 D-value는 14일은 5.37분, 28일은 11.3분, 42일은 9.61분으로 14일 배양을 제외한 배양기간에서 다른 온도에서 보다 높게 나타났지만 각 배양기간별 유의적 차이는 나타나지 않았다($P > 0.05$). 37°C에서는 14일, 28일, 42일에서 각각 8.21분, 5.65분, 5.66분으로 나타났고, 14일은 28일, 42일 보다 유의적으로 낮은 D-value를 나타내었으나 ($P \leq 0.05$) 28일과 42일간에는 유의적 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$). 가장 낮은 온도인 25°C에서는 14일, 28일, 42일에서 각각 7.70분, 5.02분, 5.13분으로 다른 온도에서 보다 낮게 나타났고 37°C와 마찬가지로 14일은 28일, 42일보다 유의적으로 낮은 수준을 나타내었으나($P \leq 0.05$) 28일과 42일간에는 유의적 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$). 또한 14일, 28일, 42일 각 기간에서 온도가 증가할수록 D-value는 점차 증가하였지만 유의적 차이는 없었다($P > 0.05$).

A. Ferna´ndeza 등 (2001)의 연구에서 5일 동안 32°C에서 형성된 포자의 $D_{90°C}$-value는 4.04분으로[14] 본 연구에 형성된 포자의 열 저항성과 유사하며, P. Setlow 등 (2006)은 23°C에서 형성된 wild-type 포자의 $D_{90°C}$-value는 18분으로[15] 실험실에서 배양된 포자보다 더 높은 열 저항성이 나타나는 것을 확인하였다.

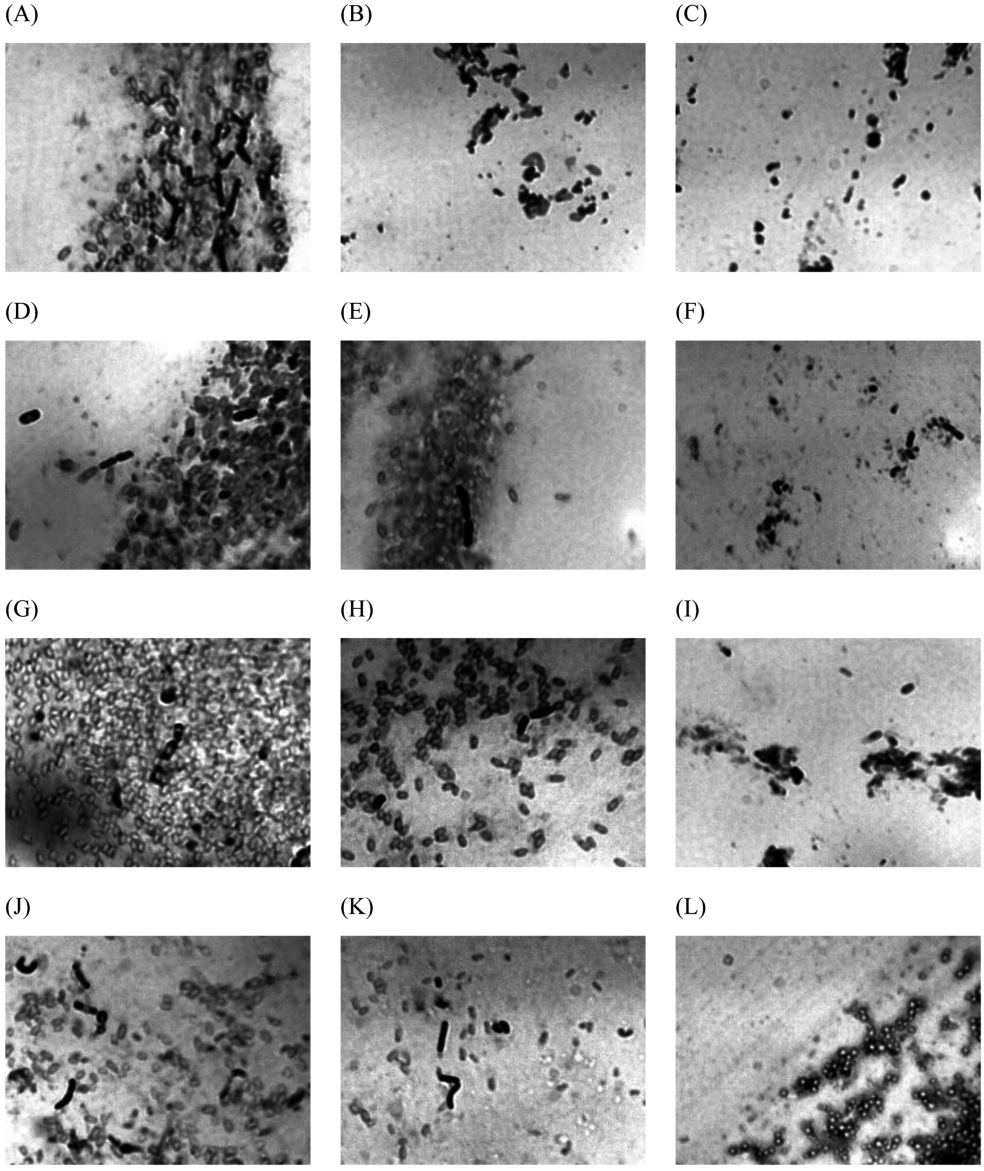

Fig. 4. Light microscope photographs of *Bacillus cereus* ATCC 10876 cultured on various kinds of agar media at 25°C, 37°C, 43°C for 21 days. (A) BCSA at 25°C, (B) BCSA at 37°C, (C) BCSA at 43°C, (D) BHI at 25°C, (E) BHI at 37°C, (F) BHI at 43°C, (G) NA at 25°C, (H) NA at 37°C, (I) NA at 43°C, (J) PDA at 25°C, (K) PDA at 37°C, (L) PDA at 43°C.

본 연구는 실험실에서 여러 조건에 따른 *B. cereus*의 포자 형성능력과 형성된 포자의 열 저항성을 살펴 보았다. 25°C에서 *B. cereus*의 포자가 전반적으로 가장 높은 수준으로 형성되었으나, 43°C에서 28일 간 형성된 포자의 열 저항성이 가장 높았다. 본 연구에서는 시간이 경과 함에 따라 많은 포자와 강한 포자가 형성 될 것을 예측하여 더 긴 시간(2-6주) 동안 포자의 형성을 관찰 한 결과 시간에 따른 유의적 차이는 보이지 않았다. wild-type 포자 형성 시 다양한 요인에 영향을 받는 것처럼 실험실에서 배양한 포자가 각각의 스트레스 요인들과 조건들 속에서 생성된 포자의 양과 특성이 달라질 수 있다. 기존의 많은 연구들이 독소형 식중독균인 *B. cereus*의 포자를 제어하기 위하여 다양한 방법들을 사용하였고, 이러한 *B. cereus* 저감화를 위한 연구는 꾸준히 이루어질 것으로 생각한다. 하지만 실험실에서 형성된 포자의 특성에 따라서 *B. cereus* 포자의 저해에 대한 효과는 매우 큰 차이를 나타낼 수 있다. 따라서 다양한 조건에서의 *B. cereus*의 포자 형성과 형성된 포자의 특성에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 식품이나 식품 가공 중 *B. cereus*의 포자를 제어하는 연구에 기초방법으로 저항성이 강한 포자를 수

Table 1. Thermal resistances of *Bacillus cereus* spores cultured for 14 to 42 days at three different temperatures (25, 37, or 43°C)

Temperature (°C)	Time (days)	D-value (min)[1]
25	14	7.70 ± 0.53[B2]
	28	5.02 ± 1.31[A]
	42	5.13 ± 0.74[A]
37	14	8.21 ± 0.44[B]
	28	5.65 ± 1.40[A]
	42	5.66 ± 0.51[A]
43	14	5.37 ± 1.14[A]
	28	11.30 ± 4.99[A]
	42	9.61 ± 2.28[A]

[1]Data represent means ± standard deviation of three measurements.
[2]Values followed by different letters within each temperature are statistically different ($P \leq 0.05$).

집하기 위한 다양한 조건(온도, 배지, 배양시간)에서 포자의 형성을 살펴 보고 수집된 포자의 열 저항성을 살펴 보았다. 그 결과 전반적으로 25°C에서 많은 포자가 형성 되었으며 43°C에서 형성된 포자가 강한 열 저항성을 가지는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Kramer, J.M. and Gilbert, R.J.: *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *In Foodborne Bacterial Pathogens.* (Doyle, M.P. ed) Marcel Dekker Inc., London, pp. 21-70 (1989).
2. Ankolekar, C., Rahmati, T. and Labbé, R.G.: Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spore in U.S. rice, *Int. J. food microbial.*, **128**, 460-466 (2008).
3. Granum, P.E.: *Bacillus cereus*. *In Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, 2nd Ed. (Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. eds.) ASM Press, Washington, D.C. pp. 373-381 (2001).
4. Monika, E.S., Fricker, M. and Scherer, S.: *Bacillus cereus* the causative agent of an emetic type of food-borne illness, *Mol. Nutr. Food Res.*, **48**, 479-487 (2004).
5. Agata, N., Ohta, M., Mori, M. and Isobe, M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 17-20 (1995).
6. Granum, P.E.: *Bacillus cereus* and its toxins, *J. Appl. Bacteriol. Symp.*, **76**, 61-66 (1994).
7. ICMSF: 5. characteristics of microbial pathogens. *In Microorganisms In foods*. Blackie Academic & Professional, London (1996).
8. Ryu, J.H. and Beuchat, L.R.: Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.*, **68**, 2614-2622 (2005).
9. Berber, İ., Çökmüs, C. and Atalan, E.: Effects of Some Pesticides on Spore Germination and Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* 2362 Strain. *Turk. J. Biol*., **28**, 15-21 (2003).
10. Leguérinel, I., Couvert, O. and Mafar, P.: Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation, *Int. J. food microbial.*, **114**, 100-104 (2006).
11. Hornstra, L.M., Leeuw, P.L., Moezelaar, R., Wolbert, E.J., Vries, Y.P. and Abee, T.: Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel, *Int. J. food microbiol.*, **116**, 367-371 (2007).
12. Milner, J.L., Stohl, E.A. and Handelsman, J.: Zwittermicin A Resistance Gene from *Bacillus cereus*, *J. bacteriol*., **178**, 4266-4272 (1996).
13. Fenselau, C., Havey, C., Teerakulkittipong, N., Swatkoski, S., Laine, O. and Edwards, N.: Identification of beta-lactamase in antibiotic-resistant *Bacillus cereus* spores, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 904-906 (2007).
14. Fernandez, A., Ociob, M.J., Fernandez, P.S. and Martýnez, A.: Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores, *Int. J. Food Microbiol.*, **63**, 257-264 (2001).
15. Setlow, P.: Spores of *Bacillus subtilis* their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals, *J. Appl. Microbiol.,* **101**, 514-525 (2006).