

들깨잎과 생산환경에서 분리한 *Bacillus cereus*의 독소 유전자와 항생제 감수성 분석

김세리¹ · 이지영¹ · 이서현¹ · 류경열¹ · 박경훈¹ · 김병석² · 윤요한³ ·
심원보⁴ · 김경열⁴ · 하상도⁵ · 윤종철¹ · 정덕화^{4*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과, ²농촌진흥청 기획조정관 행정법무담당관실,
³숙명여자대학교 생활과학부 식품영양학과, ⁴경상대학교 응용생명과학부, ⁵중앙대학교 식품공학과

Profiles of Toxin Genes and Antibiotic Susceptibility of *Bacillus cereus* Isolated from Perilla Leaf and Cultivation Areas

Se-Ri Kim¹, Ji-Young Lee¹, Seo-Hyun Lee¹, Kyoung-Yul Ryu¹, Kyeong-Hun Park¹, Byung-Seok Kim², Yo-Han Yoon³,
Won-Bo Shim⁴, Kyoung-Yul Kim⁴, Sang-Do Ha⁵, Jong-Chul Yun¹, and Duck-Hwa Chung^{4*}

¹Microbial Safety Division, Department of Agro-Food Safety, NAAS, RDA

²Administrative Management & Legal Affairs Office, RDA

³Department of Food & Nutrition, Sookmyung Women's University

⁴Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

⁵Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Abstract Two-hundred *Bacillus cereus* isolated from perilla leaf cultivation areas in Miryang, Korea were investigated for toxin genes and antibiotic susceptibility. Toxigenic patterns of isolates were identified to be 11 groups through toxin gene profiles. 21% of strains isolated from the perilla leaves had both enterotoxin and emetic toxin. Toxin genes *entFM* (100%), *nheA* (100%) and *hbla*, C, D (65.5%) were frequently found in the perilla leaves, whereas EM (21.0%) was less common. Most isolates were susceptible to 10 antibiotics, but they were highly resistant to penicillin (100%), ampicillin (100%), oxacillin (94.9%), amoxicillin-clavulanic acid (95.6%), cefazolin (78.2%), and rifampicin (58.0%). These results indicate that food-borne outbreak caused by *B. cereus* might lead to diarrhea and emetic syndromes.

Keywords: perilla leaves, *Bacillus cereus*, toxigenic genes, antibiotic susceptibility

서 론

최근 국민들은 생활수준향상과 건강에 대한 관심 증대로 조리하지 않고 바로 섭취하는 신선 농산물을 선호하고 있어 그로 인한 식중독발생보고 건수도 증가하고 있다(1,2). 농산물 안전성을 위협하는 식중독사고의 원인이 되는 병원성 미생물 오염은 재배 단계에서 유통과정에 이르는 전 단계에서 일어날 수 있으며, 특히 생산현장에서 토양이나 오염된 관개용수, 비위생적인 수확 후 환경 및 작업자는 직접적인 오염원이 될 수 있다는 보고가 있다(3). 식중독 원인균으로는 *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Camphylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* 등이 있다(4). 그 중 토양 유래세균인 *B. cereus*는 농산물에서 빈번하게 검출된다고 보고되고 있다(5-7).

*B. cereus*는 구토 혹은 설사를 일으키는 독소형 식중독 세균으로 알려져 있다. *B. cereus*에 의한 설사형 식중독은 *B. cereus*가 소장에서 증식하는 동안 생성되는 장독소(enterotoxin)에 의해 유발된다. *B. cereus*가 생산하는 설사형 식중독을 유발하는 독소는 haemolysin BL(HBL), non-haemolytic enterotoxin(NHE), cytotoxin K(CytK) 이 밖에도 enterotoxin T(BceT)와 enterotoxin FM(EntFM)이 있다(8-10). HBL과 NHE는 3개의 단백질로 구성되어 있으며 이에 반해 EntFM, BceT와 CytK는 하나의 단백질로 구성되어 있다. 구토형식중독은 emetic toxin(EM)에 의해 유발되는 식중독이며 구토를 유발하는 독소는 저분자펩타이드로 126°C로 90분간 가열하여도 파괴되지 않는 열저항성과 산, 알칼리, 단백질 가수분해효소에도 저항성을 가지고 있다(11).

*B. cereus*에 의한 식중독사례를 보면 설사형 식중독은 육류, 채소의 스프, 소시지, 크림이 원인식품이었으며 사고 발생당시의 식품 속에 존재하는 *B. cereus*의 농도는 5.0×10^5 - 9.5×10^8 /g이었다. 또한 구토형 식중독은 쌀밥이나 볶음밥이 원인식품이었으며, 식중독 발생과 관련된 식품에서 1.0×10^3 - 5.0×10^{10} /g으로 설사형보다 낮은 농도에서 식중독 발생이 가능하다(12). 따라서 식품에 따라 *B. cereus*의 유형이 다르며 독소유형에 따라 식중독 발생가능농도가 달라 질 수 있기 때문에 식품속의 *B. cereus*의 분포와 농도, 그리고 독소유형의 분석은 농산물 중 위해평가의 근거 자료를 위해 필요하다.

*Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Division of Applied Life Science Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

Tel: 82-55-772-1903

Fax: 82-55-757-5485

E.mail: dhchung@gnu.ac.kr

Received September 27, 2010; revised December 13, 2010;

accepted December 14, 2010

그리고 최근 가축의 사육과 수산양식 및 농작물을 재배하는 농장에서 질병 예방과 성장 촉진을 목적으로 많은 항생제를 사용하고 있다. 이로 인하여 농축산물에서 분리된 균주들도 항생제 저항성을 보이고 있어 항생제 내성문제는 의약계만의 문제가 아니다. 농산물에서의 항생제 내성균의 출현을 우려하는 이유는 농업현장에 분포하는 세균이 항생제 내성을 갖게 되면 인간에게 감염을 일으키는 세균에게 내성유전자를 전파할 수 있기 때문이다. 이러한 항생제 내성문제에 대응하기 위해서는 무엇보다도 먼저 항생제 내성균의 발생실태 파악이 필요하다(13).

따라서 본 연구에서는 병원체를 사멸시키거나 그 수를 감소시키는 가공공정 과정을 거치지 않아 잠재적 위해성이 높고 국내에서 일일 소비량이 많은 들깨잎을 중심으로 생산환경과 들깨잎에서 분리하여 설사형독소 5종과 구토형 독소 생성 유전자를 분석하고 각종 항생제에 대한 저항성 분포를 조사하였다.

재료 및 방법

장소 선정 및 시료 채취

본 연구는 들깨잎 주생산지인 밀양지역 38농가에서 들깨잎을 수집하여 *B. cereus*를 분리하였다. 이후 5곳의 농장을 선정하여 들깨잎이 접촉 가능한 토양, 관개용수, 작업자, 수확 후 환경에서 *B. cereus*를 분리 하였다. 분리된 *B. cereus*에 대하여 독소유전자와 항생제 감수성조사를 실시하였다.

들깨잎의 *B. cereus* 오염도 조사를 위한 시료채취는 수확·포장과정을 거쳐 박스에 담긴 들깨잎을 시료채취용 팩에 담아와 본 연구에 사용하였다. 또한 들깨잎의 생산 환경에서의 *B. cereus* 분포를 조사하기 위한 시료 채취 과정은 다음과 같다. 토양의 경우 하우스 내의 토양을 약 100 g씩 시료채취용 팩에 채취하였다. 들깨잎에 사용되는 관개용수는 분수 호스내에 있는 물을 채취하였고, 지하수나 지표수는 수원(水源)으로부터 퍼올린 물을 1L씩 채수병에 채취하였다. 또한 들깨잎 포장 작업 시에는 들깨잎의 시들음 방지를 위해서 사용하는 물은 분무기에 담긴 물 약 500 mL 정도를 1L 채수병에 채취하였다. 들깨잎 농장의 수확용기와 작업도구는 사용 중인 것을 채취하였고 포장 비닐은 사용 전의 것을 대상으로 하였다. 작업자의 복장은 농장에서 일하는 작업자의 상의를 대상으로 하였으며 수확용기, 작업도구 및 작업자 복장은 10 cm×10 cm 크기의 면적대를 사용하여 100 cm²의 면적을 면봉으로 문질러 채취하였다(14). 또한 작업자의 손은 0.85% 생리식염수 50 mL을 멸균 팩에 붓고 손을 넣어 30초간 씻어서 손에 있는 미생물을 채취하는 glove juice법으로 하였다(15). 들깨잎은 수확 전 하우스에 심겨진 들깨잎과 수확·포장이 끝나 박스에 담긴 들깨잎을 대상으로 채취하였으며 채취량은 수확 전의 것은 36장 수확 후의 것은 3개 묶음(1묶음=12장)을 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였으며 이렇게 채취된 모든 시료는 얼음을 채운 아이스박스에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였다(Table 1).

B. cereus 분리 및 동정

수집된 시료에서 *B. cereus*를 200 균주(재배환경: 관개용수 14주, 토양 11주, 수확 후 환경: 수확용기 34주, 포장대 21주, 포장비닐 9주, 작업자: 작업자 복장 14주, 작업자 손 2주, 들깨잎 95주)를 분리하였으며 분리, 동정법은 다음과 같다. 먼저 각종 용수와 생산환경에서 채취된 시료의 경우 30초간 진탕하고 이후 단계희석을 하였다. 희석된 검액을 각 농도별로 250 µL씩 MYP agar 4 plate에 접종하였다. 들깨잎과 토양은 25 g을 취하여 225 mL의 phosphate buffered dilution water을 가하여 2분간 stomach에서

Table 1. Samples for investigation of characteristics of *B. cereus* isolated from cultivation area of perilla leaves

Source	Unit of sample	No. of sample
Soil	100 g	15
Ground water	1 L	15
Irrigation water	1 L	12
Collection container	100 cm ²	15
Packing table	100 cm ²	15
Water in spray	500 ml	15
Packing vinyl	100 cm ²	15
Hands	1 hand	15
Clothes	100 cm ²	15
Perilla leaves (Green house)	36 leaves	15
Perilla leaves (Packed)	36 leaves	129
Total		276

균질화하였다. 균질화한 검액을 단계희석 한 후 각 희석농도에 대하여 250 µL씩 MYP agar 4 plate에 접종하였다. 접종된 plate는 30°C, 48시간 배양한 후 분홍색 환이 있는 집락 5주를 선발하여 NA배지에 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 PCR법에 의하여 확인하였다(16).

B. cereus 검출을 위한 DNA 추출은 분리균주를 Luria-Bertani (LB) broth 5 mL에 접종한 후 37°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액 1 mL씩 취하여 13,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 얻은 pellet을 멸균된 3차 증류수 300 µL를 가하고 13,000 rpm에서 5분 원심 분리하였다. 이후 3차 증류수 300 µL를 가하고 95°C, 10분간 반응시켜 13,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 이를 PCR에 사용하였다. *B. cereus*를 검출하기 위한 PCR 조건은 Choo 등(6)의 방법으로 수행하였다. *B. cereus*를 검출하고 *gryB*유전자 *cry*유전자를 대상으로 multiplex PCR을 수행하였다. PCR 반응은 Intron사(Seongnam, Korea)의 i-star Taq PCR kit을 사용하였으며 DNA 5 µL primer는 10 pM 농도로 2쌍 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 20 µL로 조절하였다. 또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 94°C에서 5분간 pre denaturation을 실시한 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 2분간 각각 primer annealing, 72°C에서 1.5분간 extension의 조건으로 30 cycle을 수행하고, final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.0% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다. 대조군으로는 *B. cereus* ATCC 10876와 *B. thuringensis* ATCC 29730을 사용하였다.

독소유전자 분석

분리된 *B. cereus*에서 5개의 설사형 독소와 구토형 독소유전자를 PCR로 확인하였고 독소유전자 검색에 사용된 DNA는 *B. cereus* 동정에 사용된 것과 동일한 것을 사용하였다.

Primer는 Yang 등(17)의 연구에서 개발된 것으로 여섯 종류의 독소에 대한 primers의 특이적 염기서열은 Table 2에 나타난 바와 같으며 각각의 primer는 Bioneer사(Chengwon, Korea)에서 합성하였다. 12쌍의 primer를 4쌍씩 3번의 multiplex PCR로 나누어 반응을 시켰으며 PCR 반응은 Intron사의 i-star Taq PCR kit을 사용하였으며 DNA 5 µL, primer는 10 pM 농도로 4쌍씩 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 20 µL로 조절하였

Table 2. Primers used to detect the enterotoxin genes and emetic-specific sequence of *B. cereus* isolated from perilla leaves farms

Type of syndrome	Target toxin	Gene	Primer	Oligonucleotide (5' to 3')
Diarrhea	HemolysinBL	<i>hblA</i>	hblA-F	ATT AAT ACA GGG GAT GGA GAA ACT T
			hblA-R	TGA TCC TAA TAC TTC TTC TAG ACG CTT
		<i>hblC</i>	hblC-F	CCT ATC AAT ACT CTC GCA ACA CCA AT
	hblC-R		TTT TCT TGA TTC GTC ATA GCC ATT TCT	
	<i>hblD</i>	hblD-F	AGA TGC TAC AAG ACT TCA AAG GGA AAC TAT	
		hblD-R	TGA TTA GCA CGA TCT GCT TTC ATA CTT	
	Nonhemolytic toxin	<i>nheA</i>	nheA-F	ATT ACA GGG TTA TTG GTT ACA GCA GT
			nheA-R	AAT CTT GCT CCA TAC TCT CTT GGA TGC T
		<i>nheB</i>	nheB-F	GTG CAG CAG CTG TAG GCG GT
	nheB-R		ATG TTT TTC CAG CTA TCT TTC GCA AT	
<i>nheC</i>	nheC-F	GCG GAT ATT GTA AAG AAT CAA AAT GAG GT		
	nheC-R	TTT CCA GCT ATC TTT CGC TGT ATC TAA AT		
Enterotoxin FM	<i>emFM</i>	emFM-F emFM-R	CAA AGA CTT CGT AAC AAA AGG TGG T TGT TTA CTC CGC CTT TTA CCA ACT T	
Enterotoxin T	<i>bceT</i>	bceT-F bceT-R	AGC TTG GAG CGG AGC AGA CTA TGT GTA TTT CTT TCC CGC TTG CCT TTT	
Cytotoxin K	<i>cytK1</i>	cytK1-F	ATC GGG CAA AAT GCA AAA ACA CAT	
		cytK1-R	ACC CAG TTT GCA GTT CCG AAT GT	
<i>cytK2</i>	cytK2-F	ATC GGT CAA AAT GCA AAA ACA CAT		
	cytK2-R	ACC CAG TTA CCA GTT CCG AAT GT		
Emetic	Emetic toxin	Emetic strain-specific sequence	EM-F EM-R	AGC TTG GAG CGG AGC AGA CTA TGT GTA TTT CTT TCC CGC TTG CCT TTT
		Internal transcribed spacer	its-F its-R	AAT TTG TAT GGG CCT ATA GCT CAG CT TTT AAA ATA GCT TTT TGG TGG AGC CT

Table 3. Antibiotics used for the antibiotic resistance test

	Group	Antibiotic
β-Lactam	Penicillin	Penicillin (P), Ampicillin (AMP), Oxacillin (OX)
	β-Lactam/β-Lactamase inhibitor combinations	Amoxicillin-clavulanic acid (AMC)
	Cephems	Cefazolin (KZ), Cephalothin (KF)
	Carbapenems	Imipenem (IPM)
	Aminoglycosides	Gentamicin (CN)
Non β-Lactam	Glycopeptides	Vancomycin (VA)
	Tetracyclines	Tetracycline (TE)
	Fluoroquinolones	Ofloxacin (OFX), Norfloxacin (NOR)
	Macrolides	Erythromycin (E)
	Ketolide	Telithromycin (TEL)
	Folate pathway inhibitor	Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)
	Phenicols	Chloramphenicol (C)
	Ansamycins	Rifampin (RD)
	Streptogramins	Quinupristin-dalfopristin (QD)

다. 또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 94°C에서 5분간 predenaturation을 실시한 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 각각 primer annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 30 cycle을 수행하고, final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 2.0% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

병원성 미생물의 분리와 *B. cereus*의 toxin gene 생성여부 검색에 양성 대조군으로 사용된 표준 균주는 *B. cereus* ATCC 14579

를 사용하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 National committee for clinical laboratory standards(NCCLS) 가이드라인을 참조하였고 또한 본 연구에 사용된 항생제 종류는 Table 3에서 보는 바와 같다(18).

집중 균액은 Muller-Hinton broth에서 24시간 배양한 균을 멸균 생리식염수로 희석하여 Mac-Farland scale No 0.5 BaSO₄ 표준비

Table 4. Detection of *B. cereus* from different samples collected from 5 perilla leaves farms (Unit: log CFU/g, mL, 100 cm², hand)

Farm	Irrigation water	Soil	Collection container	Packing table	Packing vinyl	Hand	Clothes	Perilla leaves (house)	Perilla leaves (packed)
A	0.20±0.17	0.00±0.00	5.50±0.10	2.94±2.56	0.00±0.00	0.57±0.99	3.93±0.90	0.74±1.05	1.52±1.38
B	0.26±0.45	1.73±1.61	2.84±0.61	1.72±1.49	0.00±0.00	0.33±0.58	0.90±1.56	0.00±0.00	0.49±0.85
C	0.00±0.00	1.64±2.85	2.57±0.39	1.70±1.49	0.00±0.00	0.00±0.00	0.83±1.43	0.77±0.68	0.77±0.68
D	0.63±0.55	2.38±0.33	1.74±0.18	2.92±0.28	2.18±0.66	0.00±0.00	0.87±0.81	0.00±0.00	1.28±1.44
E	0.33±0.58	3.80±0.23	1.98±1.72	0.53±0.92	0.00±0.00	0.00±0.00	2.34±2.02	0.00±0.00	1.49±0.50

색판(1.175% BaCl₂, 0.5 mL+0.36 N H₂SO₄, 99.5 mL: 10⁸ CFU/mL)에 맞추었다. 평판배지는 Muller-Hinton broth를 121°C에서 15분간 멸균한 후 45-50°C로 식히고 직경 90 mm의 페트리디쉬에 20 mL씩 분주하였다. 접종 균액을 배지 전체에 골고루 도말한 다음 상온에서 10분간 정치시켜 습기를 제거하였다. 항균제 디스크를 20 mm 간격으로 배지 표면에 부착시킨 후 37°C에서 24시간 배양하였으며 NCCLS의 기준에 따라 감수성 여부를 판단하였다. 대조군으로는 *E. coli* ATCC 25922과 *S. aureus* ATCC 25923을 사용하였다. 항생제 선정은 *S. aureus*의 경우 NCCLS 가이드라인에서 추천하는 항생제를 선정하였고 *B. cereus*에 대한 기준은 NCCLS 가이드라인에 설정되어 있지 않아 같은 그람양성균인 *S. aureus*의 항생제 감수성 기준을 적용하였다.

결과 및 고찰

***B. cereus*의 오염분포**

들깨잎에서 *B. cereus*를 조사한 결과, 검출빈도는 46.5%였고 오염수준은 0-3.81 log CFU/g이었으며 2곳의 농가에서는 3.00 log CFU/g 이상으로 높게 검출되었다. 또한 들깨잎 생산환경에서 *B. cereus*의 분포를 조사한 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 다양한 시료에서 검출되었고 오염정도는 시료와 농가에 따라 다소 차이는 있었다. *B. cereus*의 검출수준이 상대적으로 높은 시료는 토양, 수확용기, 포장대, 작업자의 복장이었다. 이들 시료의 검출 수준은 0-5.50 log CFU/g, 100 cm²였고, 그 중 수확용기에서 1.74-5.50 log CFU/100 cm²으로 가장 오염도가 높았다. 또한 수확 전 들깨잎(0-0.74 log CFU/g)보다 수확 후 들깨잎(0.49-1.52 log CFU/g)에서 *B. cereus* 수준이 높았다. 이는 수확, 선별, 포장과정을 거치면서 오염된 기구나 작업자에 의한 교차오염으로 판단되며 오염된 환경은 들깨잎의 오염으로 직접 연결될 수 있음을 확인할

수 있는 결과이다. 따라서 들깨잎 생산에서 *B. cereus*의 오염을 최소화하기 위해서는 재배-수확 후 단계에 이르는 전 단계의 위생관리가 필요하다. 먼저 재배단계에서는 부적절한 퇴비사용은 금해야하며 비닐 멀칭을 하여 되도록 들깨잎이 토양에 닿는 것을 최소화해야 할 것으로 생각된다. 수확·포장 후 과정에서 미생물학적 교차오염을 예방하기 위해서는 우선 각종 용기나 기구를 위생적으로 보관하기 위한 공간을 마련하여 적체적소에 보관하고 매일 작업이 끝난 후에는 청소하여 작업실 내부를 청결하게 유지하여야 한다. 또한 작업자에 의한 교차오염을 예방하기 위해서 손을 씻는 시설과 화장실과 같은 개인위생을 향상시킬 수 있는 시설을 설치하고 작업 전·후에 손을 씻는 작업이 필요하다고 생각된다.

***B. cereus*의 독소 유전자 분석**

*B. cereus*는 독소형 식중독균으로 세균자체에 의해서라기보다 *B. cereus*가 생성하는 독소에 의해서 식중독이 발생하므로 haemolytic BL(*hblA*, *hblC*, *hblD*), non-haemolytic enterotoxin (*nheA*, *nheB*, *nheC*), enterotoxin FM(*entFM*), enterotoxin T (*bceT*), cytotoxin K(*cytK*), emetic toxin(EM) 생성유전자를 PCR로 검색하였다. 그 결과 Fig. 1과 Table 5와 같이 200주의 *B. cereus*는 2가지 독소유전자를 보유하는 그룹에서부터 11가지 독소유전자 모두를 갖는 그룹까지 총 11개로 구분되었다. 각 독소 유전자 type별 분포는 Table 6에서 보는 바와 같이 *nheA*, *nheB*와 *entFM* 유전자를 보유하고 있는 type 2가 15.5%, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *entFM* 및 *cytK* 유전자를 보유하고 있는 type 9가 17.0%였다. 또한 구조형과 실사형 독소유전자 11종 모두 지니고 있는 type 11이 21.0%로 가장 높은 빈도를 보였다. 생산환경에서 분리된 균주와 들깨잎에서 분리된 균주의 독소유전자 패턴을 비교해보면 Table 6에서 보는 바와 같이 그 패턴이 유사하

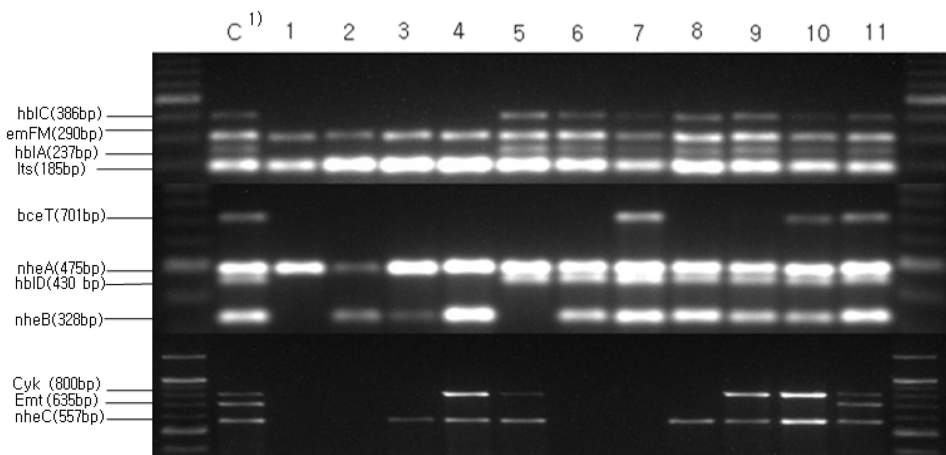


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns from different toxigenic *B. cereus* strains. ¹⁾C: control - *B. cereus* ATCC 14579

Table 5. Toxigenic patterns of *B. cereus* strains isolated from 5 perilla leaves farms

Toxigenic pattern type	Enterotoxin									Emetic toxin
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>entFM</i>	<i>becT</i>	<i>cytK</i>	EM
1	- ¹⁾	-	-	+ ²⁾	-	-	+	-	-	-
2	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
3	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
4	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
5	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
6	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
7	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾ -: negative
²⁾ +: positive

Table 6. Toxigenic patterns of *B. cereus* strains isolated from perilla leaves farms

Unit: % (No.)

Toxigenic pattern type	Environment				Perilla leaves (n=95)	Total (n=200)
	Cultivation environment (n=25)	Post harvest environment (n=64)	Worker (n=16)	Sub total (n=105)		
1	0.0(0)	4.7(3)	0.0(0)	2.9(3)	2.1(2)	2.5(5)
2	20.0(5)	17.2(11)	25.0(4)	19.0(20)	11.6(11)	15.5(31)
3	4.0(1)	6.3(4)	0.0(0)	4.8(5)	14.7(14)	9.5(19)
4	28.0(7)	4.7(3)	0.0(0)	9.5(10)	2.1(2)	6.0(12)
5	0.0(0)	4.7(3)	0.0(0)	2.9(3)	0.0(0)	1.5(3)
6	0.0(0)	12.5(8)	0.0(0)	7.6(8)	2.1(2)	5.0(10)
7	8.0(2)	18.8(12)	0.0(0)	13.3(14)	8.4(8)	11.0(22)
8	0.0(0)	7.8(5)	0.0(0)	4.8(5)	5.3(5)	5.0(10)
9	20.0(5)	6.3(4)	18.8(3)	11.4(12)	23.2(22)	17.0(34)
10	0.0(0)	9.4(6)	6.3(1)	6.7(7)	5.3(5)	6.0(12)
11	20.0(5)	7.8(5)	50.0(8)	17.1(18)	25.3(24)	21.0(42)

였다. 즉, 생산환경에서 분리된 균주는 type 2, type 7, type 9, type 11이 각각 19.0, 13.3, 11.4, 17.1%의 비율로 분포하고 있었고, 들깨잎에서 분리된 균주는 type 2, type 3, type 9, type 11이 각각 11.6, 14.7, 23.2, 25.3%의 비율을 보였다.

Yang 등(17)이 타이완에서 *B. cereus* 식중독을 유발했던 균주와 식중독을 유발하지는 않았지만 식품에서 분리한 균주를 대상으로 본 연구와 같은 독소유전자를 가지고 독소유전자패턴을 조사한 결과 총 10개의 독소유전자 패턴을 얻었으며, 식중독을 유발했던 균주의 독소유전자 패턴은 본 연구의 type 2, type 4, type 9, type 10에 해당하는 균주가 각각 27.9, 21.3, 23.4, 17%로 나타났다 6가지 독소를 모두 생성하는 균주는 없었다. 또한 Kim 등(19)이 한국의 고춧가루, 쌀, 선식에서 분리한 *B. cereus*의 독소유전자 패턴을 조사한 결과 본 연구의 type 10, type 9, type 3에 해당하는 균주가 각각 52.8, 28.3, 10.5%였다. 국내에서 분리된 *B. cereus*이지만 분리 대상 농산물이 다를 경우에 생성할 수 있는 독소유전자의 패턴도 차이가 있음을 알 수 있다.

들깨잎 및 생산환경에서 분리한 균주들을 독소유전자별 분포 현황을 나타낸 결과는 Table 7과 같다. *hblA*, *hblC*, *hblD*가 66.5%, *nheA*가 100%, *nheB*가 96.0%, *nheC*가 66.0%, *entFM*이 100%, *bec T*가 38.0%, *cytK*가 51.5%, EM이 21.0%가 검출되었다. 또한 들깨잎과 생산환경에서 분리된 균주들의 독소유전자의 분

포는 서로 유사하였다. *B. cereus*가 heamolysin BL이 식중독을 유발하기 위해서는 *hblA*, *hblC*, *hblD*가 모두 존재하여 단백질을 생성할 때 가능하다고 보고되어있다. 하지만 nonheamolytic enterotoxin에 의한 식중독이 발생하기 위해서는 *nheA*와 *nheB* 유전자에 의해 생성된 단백질만 있어도 가능하기 때문에 분리된 균주의 96%는 nonheamolytic enterotoxin을 생성할 수 있다(11-13).

Wijnands 등(20)이 네덜란드에 유통되는 다양한 식품을 대상으로 *B. cereus*를 분리하고 독소유전자인 *hbl*, *nhe*, *cytK*를 검색한 결과 각각 66%, 97%, 50%의 검출비율을 보였고 Park 등(21)이 한국의 곡류에서 분리된 *B. cereus*의 독소유전자를 검색한 결과에서도 *nheA*, *hblDC*, *cytK*가 99, 84, 55%씩 각각 검출 되었다. 또한 Kim 등(19)의 연구 결과, 한국산 고추, 중국산 고추, 쌀, 선식에서 분리된 *B. cereus*는 *hblA*, *hblC*, *hblD* 는 각각 86.4%, *nheA* 100%, *nheB* 99%, *nheC* 98.7%, *entFM* 100%, *becT* 54.3%, *cytK* 86.1%, EM 0%로 검출되었고 농산물 별 독소유전자의 검출 비율에 큰 차이가 없다고 보고하였다.

이상의 다른 연구결과들과 비교해보면 농산물에서 분리된 대부분의 *B. cereus*는 *nhe* 독소유전자를 보유하고 있었으며 들깨잎에서 분리된 *B. cereus* 균주도 기존의 연구결과와 같이 *nheA*, *nheB* 유전자의 검출 비율이 높았다. 한편 들깨잎에서 EM 독소유전자가 21% 검출 된 것은 기존의 연구결과와 상이한 결과로,

Table 7. Detection of enterotoxin genes and emetic-specific sequence of *B. cereus* strains isolated from perilla leaves farms

Unit: % (No.)

Toxin gene	Environment				Perilla leaves (n=95)	Total (n=200)
	Cultivation environment (n=25)	Post harvest environment (n=64)	Worker (n=16)	Sub total (n=105)		
<i>hblA</i>	48.0(12)	67.2(43)	75.0(12)	63.8(67)	69.5(66)	66.5(133)
<i>hblC</i>	48.0(12)	67.2(43)	75.0(12)	63.8(67)	69.5(66)	66.5(133)
<i>hblD</i>	48.0(12)	67.2(43)	75.0(12)	63.8(67)	69.5(66)	66.5(133)
<i>nheA</i>	100.0(25)	100.0(64)	100.0(16)	100(105)	100.0(95)	100.0(200)
<i>nheB</i>	100(25)	90.6(58)	100.0(16)	94.3(99)	97.9(93)	96.0(192)
<i>nheC</i>	72.0(18)	46.9(30)	75.0(12)	57.1(60)	75.8(72)	66.0(132)
<i>enFM</i>	100.0(25)	100.0(64)	100.0 (16)	100(105)	100.0(95)	100.0(200)
<i>becT</i>	28.0(7)	35.9(23)	56.3 (9)	37.1(39)	38.9(37)	38.0(76)
<i>cyt K</i>	68.0(17)	32.8(21)	75.0(12)	47.6(50)	55.8(53)	51.5(103)
EM	20.0(5)	7.8(5)	50.0(8)	17.1(18)	25.3(24)	21.0(42)

Table 8. Antibiotic resistance patterns of *B. cereus* isolated from perilla leaves farms

Antibiotic resistance pattern type	β-lactam group										Non β-lactam group							
	P	AMP	OX	AMC	KZ	KF	IPM	CN	VA	TE	OFX	NOR	E	TEL	SXT	C	RD	QD
1	R ¹⁾	R	R	R	R	I ²⁾	S ³⁾	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
2	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
3	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
5	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I
6	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
7	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
9	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
10	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
12	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
13	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
15	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

P: penicillin, AMP: ampicillin, OX: oxacillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, KZ: cefazolin, KF: cephalothin, IPM: imipenem, CN: gentamicin, VA: vancomycin, TE: tetracycline, OFX: ofloxacin, NOR: norfloxacin, E: erythromycin, TEL: telithromycin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, C: chloramphenicol, RD: rifampin, QD: uinupristin-dalfopristin

¹⁾R ; Resistant, ²⁾I ; Intermediate, ³⁾S; Susceptible

들깨잎으로 인한 *B. cereus*식중독이 발생했을 경우 설사형 뿐만 아니라 구토형 식중독의 발생도 가능할 것임을 의미하는 결과이다.

항생제 내성 분석

들깨잎과 들깨잎 생산환경에서 분리한 *B. cereus*를 대상으로 18 제의 항생제 내성 패턴을 조사한 결과 Table 8에서 보는 바와 같이 200주의 균주는 15개 내성 패턴으로 구분되었다. 들깨잎과 생산환경에서 분리된 *B. cereus*의 항생제내성패턴별 분포를 나타낸 결과는 Table 9와 같다. 전반적으로는 penicillin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, cephalothin에 저항성이면서 rifampin에 중도저항성을 보인 type 4, penicillin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, cephalothin, rifampin에 저항성을 보인 type 6, penicillin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, cephalothin에 저항성을 보인 type 7이 각각 15.5, 43.5, 12.0%로 높은 비율을 차지하였다. 그

외에 나머지 12개의 type은 5%이하의 비율을 보였다. 또한 들깨잎과 생산환경에서 분리된 균주의 항생제 내성 패턴은 서로 유사하며 각 내성패턴 type별 비율은 들깨잎은 type 4, type 6, type 7이 각각 12.8, 38.3, 20.2%였고 생산환경에서 분리된 균주는 type 4와 type 6이 각각 18.1, 48.6%였다. 한편 type 7의 비율은 들깨잎에서 분리된 균주보다 그 비율이 현저하게 낮은 4.8%였다.

항생제별로는 분리된 균주 모두 penicillin과 ampicillin에 저항성을 보였으며 oxacillin에 96.0%, amoxicillin-clavulanic acid에 97.0%, cefazolin에 80.5%, cephalothin에 76.0%, imipenem에 1.5%, rifampin에 58.0%의 내성을 보였다. 또한 gentamycin, vancomycin, tetracycline, ofloxacin, norfloxacin, erythromycin, telithromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, quinupristin-dalfopristin에는 내성을 보이지 않았다(Table 10). 즉 대부분의 균주는 gentamycin을 제외한 β-lactam계 항생제에 저항성을 갖는 것으로 나타났다. Park 등(21)은 곡류에서 분리된 균주

Table 9. Antibiotic resistance patterns of *B. cereus* strains isolated from perilla leaves farms

Unit: % (No.)

Antibiotic resistance pattern type	Environment				Perilla leaves (n=95)	Total (n=200)
	Cultivation environment (n=25)	Post harvest environment (n=64)	Employee (n=16)	Sub total (n=105)		
1	0.0(0)	6.3(4)	0.0(0)	3.8(4)	0.0(0)	2.0(4)
2	0.0(0)	1.6(1)	0.0(0)	1.0(1)	1.1(1)	1.0(2)
3	0.0(0)	1.6(1)	0.0(0)	1.0(1)	5.3(5)	3.0(6)
4	4.0(1)	20.3(13)	31.3(5)	18.1(19)	12.8(12)	15.5(31)
5	4.0(1)	0.0(0)	0.0(0)	1.0(1)	6.4(6)	3.5(7)
6	72.0(18)	40.6(26)	43.8(7)	48.6(51)	38.3(36)	43.5(87)
7	0.0(0)	6.3(4)	6.3(1)	4.8(5)	20.2(19)	12.0(24)
8	0.0(0)	9.4(6)	0.0(0)	5.7(6)	1.1(1)	3.5(7)
9	8.0(2)	4.7(3)	0.0(0)	4.85(5)	1.1(1)	3.0(6)
10	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	1.1(1)	0.5(1)
11	4.0(1)	0.0(0)	0.0(0)	1.0(1)	0.0(0)	0.5(1)
12	8.0(2)	1.6(1)	18.8(3)	5.7(6)	0.0(0)	3.0(6)
13	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	4.3(4)	2.0(4)
14	0.0(0)	7.8(5)	0.0(0)	4.8(5)	1.1(1)	3.0(6)
15	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	8.5(8)	4.0(8)

Table 10. Antibiotic resistance of *B. cereus* strains isolated from perilla leaves farms

Unit: % (No.)

Antibiotic resistance pattern type	Environment				Perilla leaves (n=95)	Total (n=200)
	Cultivation environment (n=25)	Post harvest environment (n=64)	Employee (n=16)	Sub total (n=105)		
P	100.0(25)	100.0(64)	100.0(16)	100.0(105)	100.0(95)	100.0(200)
AMP	100.0(25)	100.0(64)	100.0(16)	100.0(105)	100.0(95)	100.0(200)
OX	100.0(25)	100.0(64)	100.0(16)	100.0(105)	91.6(87)	96.0(192)
AMC	100.0(25)	92.2(59)	100.0(16)	100(95.2)	98.9(94)	97.0(194)
KZ	80.0(20)	76.6(49)	81.3(13)	68.6(72)	83.2(79)	80.5(161)
KF	80.0(20)	67.2(43)	81.3(13)	62.9(66)	80.0(76)	76.0(152)
IPM	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	3.3(3)	1.5(3)
CN	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
VA	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
TE	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
OFX	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
NOR	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
E	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
TEL	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
SXT	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
C	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
RD	92.0(23)	48.4(31)	62.5(10)	61.0(64)	54.7(52)	58.0(116)
QD	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)

P: penicillin, AMP: ampicillin, OX: oxacillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, KZ: cefazolin, KF: cephalothin, IPM: imipenem, CN: gentamicin, VA: vancomycin, TE: tetracycline, OFX: ofloxacin, NOR: norfloxacin, E: erythromycin, TEL: telithromycin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, C: chloramphenicol, RD: rifampin, QD: uinupristin-dalfopristin

와 설사환자에서 분리된 균주를 대상으로 항생제 내성실험을 한 결과 β -lactam계 항생제인 penicillin(100%), ampicillin(100%), cefepime(97.7%), oxacillin(93.2%)의 내성을 보인다고 보고하였으며 Kim 등(22)도 해수에서 분리한 *B. cereus* 균주들이 gentamicin, ciprofloxacin, imipenem, chloramphenicol, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, erythromycin, vacomycin의 항생제에는 감수성이나 rifampin에 대해서는 65.9%가 저항성이라고 보고하였다. 또한 Weber 등(23)이 수행한 연구에서도 penicillin, oxacillin,

cephalosporins에 저항성을 가지고 있으나 imipenem, vacomycin, chloramphenicol, gentamicin, ciprofloxacin에 대해서는 감수성을 보인다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. *B. cereus*가 β -lactam계 항생제에 저항성을 보이는 이유는 대부분의 *B. cereus*는 β -lactamase를 생성할 수 있기 때문인데 이는 항생제 남용에 의한 항생제 내성이라기보다도 균 자체가 가지는 특성으로 보여진다(24). 하지만 Kim 등(22)의 결과나 본 연구결과에서 rifampin에 대한 저항성이 약 60% 내외로 나타난 것은 아직까지 유전학적으로

로 *B. cereus*가 rifampin에 대한 내성인자를 보유하고 있다는 보고는 없기 때문에 환경적 요인에 의해 생겨난 내성으로 추정되며 정확한 경로나 원인에 대해서는 보다 면밀한 분석이 필요하다.

따라서 항생제내성주의 발생은 식중독 발생시에 치료에 어려움을 줄 수 있으며 내성균주가 발생되면 주변의 균주로 내성유전자를 전이시켜 항생제내성이 확대될 수 있기 때문에(13) 이에 대한 예방책이 필요하다. 또한 현재 *B. cereus*에 대한 항생제 연구는 질병의 예후가 경미한 경우가 많아 연구가 많이 이루어지지 않았으나 이에 대한 연구가 체계적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 들깨잎과 들깨잎 생산환경을 대상으로 276개의 시료를 채취하여 *B. cereus*를 분리 하였다. 분리된 *B. cereus* 200주의 toxicity를 평가하고자 독소유전자와 항생제내성을 검색하였다. 그 결과 분리된 균주에서 11개의 서로 다른 독소유전자 패턴은 확인하였으며 5개의 설사형독소와 구도형 독소를 모두 생성할 수 있는 균주는 21%였다. 가장 빈번하게 검출되는 독소유전자는 *nheA*(100%), *enFM*(100%), *hblA*, *C*, *D*(66.5%)였으며 EM은 가장 낮은 빈도(21.0%)로 검출되었다. 항생제 내성평가결과 분리된 대부분의 *B. cereus*는 18종의 항생제 중 10개의 항생제에 대해서는 감수성이었으나 β-lactam계 항생제인 penicillin(100%), ampicillin(100%), oxacillin(94.9%), amoxicillin-clavulanic acid(95.6%), cefazolin(78.2%)과 비β-lactam계 항생제 rifampicin(58.0%)에 대해서 저항성을 보이는 것으로 나타났다. 들깨잎과 들깨잎 생산환경에서 분리된 *B. cereus*의 독소유전자와 항생제내성 패턴은 서로 유사하였다. 따라서 본 연구결과는 들깨잎에 오염된 *B. cereus*에 의하여 설사형 뿐만 아니라 구도형 식중독이 발생할 가능성을 시사하며 들깨잎과 생산환경에서 항생제 저항성 *B. cereus*가 검출되어 의약계뿐만 아니라 농업현장에서도 항생제내성균주 출현을 예방하는 대책이 요구된다.

문 헌

1. Sevell AM, Farber JM. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *J. Food Protect.* 64: 1863-1877 (2001)
2. 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. *Korean J. Fd. Hyg. Safety* 20: 43-47 (2005)
3. FDA. Guidance for industry, Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables. Available From: <http://csan.fda.gov>. Accessed Oct. 26, 2005.
4. Burnett SL, Beuchat LR. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices and difficulties in decontamination. *J. Ind Microbiol. Biot.* 27: 104-110 (2001)
5. Kim SH, Kim JS, Choi JP, Park JH. Prevalence and frequency of food-borne pathogens on unprocessed agricultural and marine products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 594-598 (2006)

6. Choo EY, Jang SS, Kim KS, Lee KG, Heu SG, Ryu SR. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* in dried red pepper in Korea. *J. Food Protect.* 70: 917-922 (2007)
7. Kim HJ, Lee DS, Paik HD. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from raw soybean sprouts. *J. Food Protect.* 67: 1031-1035 (2004)
8. Hansen BM, Laser TD, Hendriksen NB. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 209-213 (2001)
9. Anderson Borge GI, Skeie M, Sorhaug T, Langsrud T, Granum PE. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 237-246 (2001)
10. Phelps RJ, McKillip JL. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microb.* 68: 3147-3151 (2002)
11. Kramer JM, Gillbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. pp. 21-70. In: *Food-borne Bacterial Pathogens*. Doyle MP (ed). Marcel Dekker, New York, NY, USA (1989)
12. Chun SB. *Bacillus cereus*. p. 326. In: *Food-born Pathogens*. Jinsung Unitec, Seoul, Korea (2007)
13. Kang CS. Study on the resistance and prevention of antibiotics. Patent 21 54: 37-43 (2004)
14. Sveum WH, Moberg LJ, Rude RA, Frank JF. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. 3rd ed. American Public Health Association, Washington DC, USA. pp. 51-74 (1992)
15. Anonymous. Guidelines for Effectiveness Testing of Surgical Hand Scrub (Glove Juice Test). *Fed. Regist.* 43: 1242-1243 (1978)
16. KFDA. Korean Food code. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea. pp. 75-105 (2002)
17. Yang IC, Shih DY, Huang TP, Huang YP, Wang JY, Pan T. 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)
18. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard-9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. pp. 6-80 (2006)
19. Kim SK, Kim KP, Jang SS, Shin EM, Kim MJ, Oh SS, Ryu SR. Prevalence and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from dried red peppers, rice, and *sunsik* in Korea. *J. Food Protect.* 72: 578-582 (2009)
20. Wijnands LM, Dufrenne JB, Rombouts FM, Veld PH, Leusden FM. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands. *J. Food Protect.* 69: 2587-2594 (2006)
21. Park YB, Kim JB, Shin SW, Kim JC, Cho SH, Lee BK, Ahn JH, Kim JM, Oh DH. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *J. Food Protect.* 72: 612-617 (2009)
22. Kim SS, Park YH, Lee JS, Yoon JH, Shin YK, Rhee IK, Kim YJ. Taxonomic studies of the beta hemolysis-causing pathogen *Bacillus cereus* isolate from sea water. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 67-73 (1998)
23. Weber DJ, Saviteer SM, Rutala WA, Thomann CA. *In vitro* susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 642-645 (1988)
24. Chen Y, Tenover F, Koehler TM. β-Lactamase gene expression in penicillin-resistant *Bacillus anthracis* strain. *Antimicrob. Agents Ch.* 48: 4873-4877 (2004)