

## 쌀로부터 *Bacillus cereus* Group의 분리와 Biofilm 형성 특성

김진영 · 유혜림 · 이영덕 · 박종현<sup>†</sup>

경원대학교 식품생물공학과

### Detection of *Bacillus cereus* Group from Raw Rice and Characteristics of Biofilm Formation

Jin-Young Kim, Hye-Lim Yoo, Young-Duck Lee and Jong-Hyun Park<sup>†</sup>

Dept. of Food and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, South Korea

#### Abstract

*Bacillus cereus* is widely distributed on various foods and is known to cause clinical infections, food poisoning toxin induced diarrhea and vomiting. In this study, *B. cereus* group detected and analyzed rice, rice bran, and biofilm characterization of *B. cereus* confirmed. *B. cereus* was identified in approximately 34.6% of brown rice and 50.0% of rice bran. *B. thuringiensis* was detected in 3.9% of brown rice and 23% of rice bran, and *B. mycoides* was isolated from rice bran. The microtiter plate assay detected differences in biofilm-forming ability among *B. cereus* group isolates. Biofilm of *B. cereus* seemed to increase the MIC values of antimicrobial agent and antibiotic compounds compared with planktonic cells. Therefore, sufficient attention should be given to good manufacturing practice and good agriculture practice to avoid contamination of *B. cereus* group raw material including rice.

Key words: *Bacillus cereus* group, rice, biofilm formation, antimicrobial agents

#### 서론

국내 경제 수준의 발전에 따라 전반적인 식품 생산 환경은 보다 위생적으로 향상되었으며, 식생활의 간편화와 다양화, 집단 급식의 보편화 및 다양한 종류의 가공 식품 소비가 증가되고 있다. 이에 따라 최근에는 식중독 사고가 보다 대형화되고 있으며, 식중독 발생 시 원인 식품과 식중독 미생물에 대한 규명이 매우 어려워지고 있다. 특히 우리나라는 쌀을 주식으로 하는 식생활을 하고 있으며, 최근에는 다양한 방법을 통해 가공하여 취반용 밥, 생식, 선식, 제빵용 등으로 산업화되어 판매되고 있다. 하지만 국내에서 재배되어 시판되고 있는 쌀의 경우, 재배 환경인 국내 토양 자체가 *Bacillus* spp.가 많이 오염되어 있는 것으로 보고되고 있으며(Kim 등 2006), 최근에는 다양한 친환경 농법을 이용한 유기농 제품의 증가 및 생물 농약 제제 사용의 증가 등으로 인해 쌀에서도 오염 가능성이 증대되고 있다(Jo 등 2011). 쌀의 품질을 저하시켜 부패

를 유발하는 *Bacillus* spp.는 *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. circulans* 등이 있으며, 특히 식중독을 유발하는 *B. cereus* group의 오염도 보고되고 있다(Jeon 등 2010). *B. cereus* group은 Gram 양성이며 포자를 형성하는 통성 혐기성 세균이며, 대표적으로는 *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. (pseudo)mycoides*가 알려져 있다(Lechner 등 1998; Nakamura LK 1998). *B. cereus*는 자연계에 널리 분포되어 있으며, 볶음밥, 파스타, 삶은 고기, 조리된 채소, 수프, 샐러드, pudding, 그리고 vegetable sprout 등에 오염되어 식중독을 유발하는 것으로 보고되었다(Chang 등 2009; Oguntoyinbo 등 2010). 이러한 *B. cereus*는 식중독 유발 형태에 따라 구토형과 설사형의 두 종류가 있다(Granum 등 1997). 설사형 *B. cereus*의 독소인 enterotoxin은 분자량이 5~6만의 고분자 단백질로 장관 내에서 이 균이 증식하여 생산된다. Trypsin에 의해 분해되고 60°C, 20분간의 가열로 파괴되며, pH 변화에도 민감하다(Granum PE 1994). 반면, 구토 독소는 음식물 내에서 생산된 독소로 여과

<sup>†</sup> Corresponding author: Jong-Hyun Park, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea. Tel: +82- 31-750-5523, Fax: +82-31-750-5273, E-mail: p5062@kyungwon.ac.kr

막을 통과하는 분자량 1만 이하의 저분자 펩타이드이며, 126°C에서 90분간 가열하여도 파괴되지 않는 열 저항성과, 산, 알칼리 및 단백질 가수분해 효소에도 저항력을 갖는다(Kramer 등 1989). 그리고 *B. thuringiensis*는 균 자체 내에 아포와 단백질 결정체를 모두 포함하고 있으며, 세포내에서 합성하는 결정 단백질로  $\delta$ -endotoxin은 insecticide로서 그 생성 과정이 포자 형성 과정과 시간적으로 거의 일치하는 것으로 보고되었다(Lapidus 등1993). 특히 최근에는 *B. thuringiensis*가 *B. cereus*의 식중독 발생과 관련이 있는 것으로 알려진 유전자를 지닌 것으로 보고되어 위해성에 대한 가능성이 제기되고 있다(Granum 등 1997). 또한 *B. cereus* group 중 *B. anthracis*는 용혈성과 운동성을 보이지 않는 특징이 있으며(Henderson 등 1995), *B. mycoides*와 *B. pseudomycoides*는 한천 배지에서 rhizoid 형태로 자라는 특성이 있고, 쌀의 부패에 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Buyer JS 1995). 최근 들어 *Bacillus cereus* group 등 많은 세균들은 자연적이거나 인위적인 표면에 부착하기 위해 biofilm이라는 extracellular polysaccharide matrix를 형성하는 것으로 알려져 있다(Costerton 등 1999). 이러한 extracellular polysaccharide는 항생제 혹은 항생물질 등으로부터 자신을 물리적으로 보호하는 기능을 하며, 또한 pH, osmotic shock, 건조, 열에 노출될 경우 세균을 보호하는 것으로 보고되어 있다. *Bacillus* spp.의 경우도 다양한 extracellular polysaccharide를 생성하는 것으로 보고되어 있으며(Marinda 등 2002), *B. cereus* group 역시 토양이나 쌀 등에서 biofilm 등을 형성하여 오랜 시간 생존할 수 있다. 본 연구에서는 우리 쌀에 존재하는 식중독 유발세균인 *B. cereus* group의 분포와 분리된 *B. cereus* group에 대한 biofilm 형성 특성을 분석하고, biofilm이 형성된 *B. cereus*에 대한 항생제와 살균제에 대한 특성 변화를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *B. cereus* KCCM 40935, *B. cereus* KCCM 11773, *B. cereus* KCTC 1094, *B. thuringiensis* KCTC 1509, *B. thuringiensis* KCCM 11429, *B. thuringiensis* KCCM 11428, *B. mycoides* KCTC 3453를 한국중균협회와 한국생명공학연구원 미생물자원센터로부터 분양받았다. *B. cereus* group의 배양은 MYP agar(Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) 또는 Tryptic soy broth(Difco Laboratory)에 접종 후 37°C에서 12~18시간 배양한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 쌀로부터 *B. cereus* Group의 분리

서울, 경기, 강원도, 충청지역의 벼의 쌀을 분리원으로 사

용하였고, *B. cereus* group의 분리는 식품 공전(고시 제2011-20호)에서 제시하는 방법에 준하여 수행하였다. MYP(mannitol egg yolk polymyxin agar) agar에서 배양된 집락들 중 혼탁한 환을 형성한 분홍색 집락을 선별하였으며, *B. mycoides*의 분리는 rhizoid 형태의 집락을 선별하였다. 선별된 집락을 TSA에 평판 희석하여 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 Gram 염색과 생화학적 특성 분석을 통해 1차적으로 선별하였다.

### 3. PCR을 이용한 *B. cereus*와 *B. thuringiensis* 동정

쌀에서 분리된 *B. cereus* group으로 의심되는 분리 균주들을 대상으로 하여 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 PCR을 통해 확인하였다. 이때 증폭 유전자는 *gyrB*를 사용하였으며, *B. cereus*는 Bc1(5'-ATTGGTGACACCGATCAAACA-3'), Bc2r(5'-TCATACGTATGGATGTTATTC-3'), *B. thuringiensis*는 Bt1(5'-ATCGGTGATACAGATAAGACT-3')과 Bt2r(5'-CCTTCATACGTATGAATATTATTT-3') primer를 이용하였다(Jeon 등 2010). PCR은 Gene cycler(BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하였으며, 30 cycles로 94°C에서 1분, 58°C에서 1.5 분, 72°C에서 2.5 분, 마지막으로 72°C에서 7분을 수행하였다. PCR 산물은 0.5% TAE buffer에 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel로 전기영동한 후 UV transilluminator(Seolin Biotech, Suwon, Korea)에서 증폭 산물을 확인하였다.

### 4. *B. cereus* Group의 Biofilm 형성 특성

Biofilm 형성 특성을 비교하기 위해 *B. cereus* group 표준 균주와 분리 균주들을 10 ml TSB 배지에 접종한 후 PVC microtiter plate(Becton Dickinson Labware, NJ, USA) 각 96 well에 200  $\mu\text{l}$ 씩 각각 분주하고 4일간 배양하면서 microtiter plate assay로 측정하였다. Microtiter plate assay는 각각의 well에 있는 배양 상등액을 제거한 후 0.85% NaCl로 세척하고, 99% methanol 200  $\mu\text{l}$ 로 15 분간 처리하여 균주를 고정시켰다. 건조 후 2% hucker crystal violet용액 200  $\mu\text{l}$ 로 5분 동안 well 안에 부착된 균주를 염색하고 멸균수로 세척한 뒤 건조시켰다. 이어서 33% glacial acetic acid를 160  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 5분 동안 처리하여 유리되는 crystal violet을 550 nm에서 microtiter plate reader(Tecan, sunrise, Salzburg, Austria)로 흡광도를 측정하였다.

### 5. Biofilm 형성 *B. cereus*의 항생제와 항균제 처리에 따른 특성

Glass wool을 사용해 biofilm을 형성시킨 *B. cereus*와 부유 *B. cereus*에 대해 항균제와 항생제에 대한 최소생육저해농도를 비교하였다. Glass wool을 이용한 biofilm 형성은  $10^3$  CFU/ml의 식중독 세균을 0.5 g의 glass wool이 포함된 100 ml

Tryptic soy broth에서 37°C에서 48시간 배양한 후 0.1% crystal violet으로 염색한 후 현미경 관찰을 수행하였다. 그리고 부유세균은 배양 상등액 10 ml를 취해 사용하였으며, biofilm 형성 *B. cereus*는 배양액에서 glass wool을 제거한 후 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.9)로 두 번 세척한 후 Whatman filter paper위에서 glass wool을 건조시켰다. 건조시킨 glass wool을 45 g glass bead(직경 6 mm)를 포함한 멸균 flask에 넣고 이것에 5 ml Tris-HCl(10 mM, pH 7.4) 완충액을 넣었다. 다음 glass wool에 붙어 있던 cell들을 제거하기 위해서 10분 동안 250 rpm으로 shaking하여 5 ml Tris-HCl을 회수하고 10분 동안 원심분리(12,000×g)하여 pellet을 멸균 식염수로 현탁하여 biofilm 형성 *B. cereus*를 분리하였다. Mullar Hinton agar(Oxoid, Hampshire, England)에서 항균제로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lactic acid, acetic acid, ethanol, rhamnolipid를, 항생제로 penicillin, ampicillin, amoxicillin, cephalothin, neomycin, streptomycin, kanamycin, paromomycin, chloramphenicol, vancomycin, nalidixic acid, rifampicin, tetracyclin, lincomycin, erythromycin(Sigma-aldrich, Germany)를 사용하여 농도별로 배지를 만들어 실험에 사용하였다. Glass wool 외에 부유하고 있는 균과 glass wool로부터 취한 biofilm cell을 각 plate에 도말하고 결과를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 쌀의 일반세균 오염도

쌀겨와 쌀에서의 미생물 오염도를 측정된 결과, 총 세균의 경우 쌀겨에서 9 log CFU/g 검출되었고, 쌀에서 6.5 log CFU/g 검출되어(Fig. 1) Park 등(2003)이 행한 도정도별 중온성 세균수의 분포를 보고한 실험에서 현미와 9분 도미의 중온성 세균수가 각각 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> CFU/g으로 나타나 도정도가 높을수록 검출되는 균 수가 감소하였다는 보고와도 유사하였다. 쌀은 저장 중에 미생물의 증식으로 인해 품질이 저하되는데(Mheen 등 1982), 저장 중 오염되는 미생물은 대개 *Sphingomonas paucimobilis*와 *Arthrobacter atrocyaneus*, *Bacillus* spp.가 높은 비율을 차지한

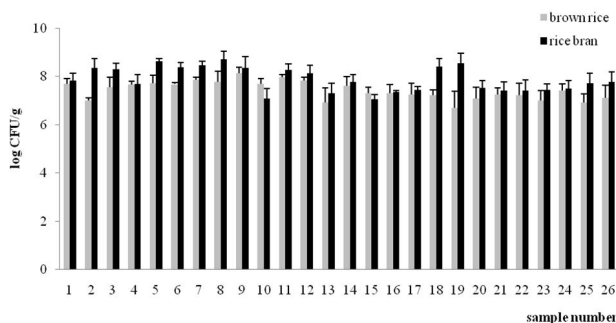


Fig. 1. Total aerobic bacteria in rice bran and brown rice.

다. 그 중 *B. cereus* group은 열 저항성을 가지며 포자를 형성하기 때문에 취반 후에도 제어하기 어렵고(Lee 등 2007), 그 중 *B. cereus*는 추위, 건조, 화학물질 처리와 같은 환경 속에서도 호기적으로 포자를 형성하며 저항력을 가져(Ham 등 2006), 이 미생물이 오염된 식품을 섭취하였을 경우 구토와 복부경련, 설사 증이 나타나므로 쌀의 가공, 저장, 유통 단계에서 위생적인 관리가 필요하다.

### 2. 쌀로부터 *B. cereus* Group의 분리와 검출

서울, 경기, 강원도, 충남 지역에서 생산되는 벼를 수집하여 무균 조각으로 쌀겨와 쌀로 분리하였다. 이후 식품공전에서 제시하는 방법으로 MYP agar에서 혼탁한 환을 형성한 분홍색 집락을 1차적으로 선별하였으며, 이 균주들은 다시 MYP agar에 희석 도말하여 균집을 선별하고 TSB에 배양하였다. 그리고 *gyrB* 유전자를 검출하는 primer를 이용해 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 동정하는 PCR을 수행하였다. *B. cereus*와 *B. thuringiensis*는 염기서열이 매우 유사하여 16S rRNA를 이용한 sequencing에서도 99% 이상의 유사성을 보이나(Seki 등 1978), Yamada 등(1999)이 고안한 primer는 reverse primer에 차이를 두어 종간의 분리가 가능하게 하므로 본 실험에서 *B. cereus*는 365 bp, *B. thuringiensis*는 368 bp의 PCR product band를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 총 26개의 쌀과 쌀겨시료 가운데, 9개의 쌀(34.6%)과 13개의 쌀겨(50.0%)에서 *B. cereus*가 검출되었으며, *B. thuringiensis*는 1개의 쌀(3.9%)과 6개의 쌀겨(23%)에서 검출되었다. *B. mycoides*는 1개 (3.8%)의 쌀겨시료에서 발견되어 전체 시료 중 *B. cereus*가 차지하는 비율이 84.6%로 가장 높았고, *B. thuringiensis*는 26.9%를 차지하여 전체적으로 *Bacillus cereus* group이 분포되어 있음을 확인하였다(Table 1). *Bacillus* spp.는 토양, 물, 공기 중에 널리 분포하여 재배 작물에 쉽게 오염되며, 작물의 제조 공정 과정에서 교차오염 되기도 하여 식품의 질을 저하시킬 수 있다. 한편,

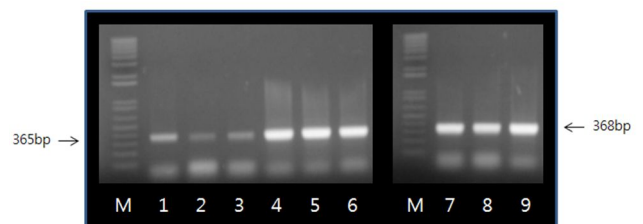


Fig. 2. Detection of *B. cereus* and *B. thuringiensis* by PCR. No.1, *B. cereus* KCTC1094; No.2, *B. cereus* B-50B; No.3, *B. cereus* B-38B; No.4, *B. cereus* KCCM 40935; No.5, *B. cereus* B-36B; No.6, *B. cereus* C-74C; No.7, *B. thuringiensis* KCTC 3452; No.8, *B. thuringiensis* B-28A; No.9, *B. thuringiensis* B-20A.

**Table 1. Prevalence of *B. cereus* group detected from raw rice** N(%)

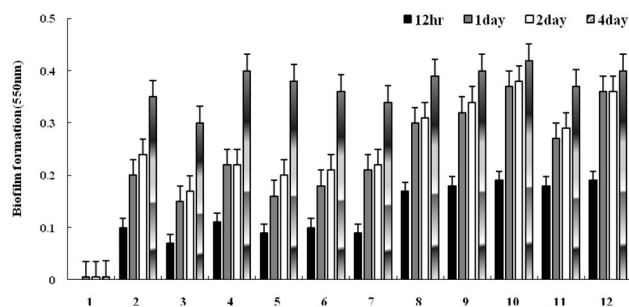
	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringensis</i>	<i>B. mycoides</i>
Brown rice	9/26(34.6)	1/26(3.8)	-*
Rice bran	13/26(50.0)	6/26(23.0)	1/26(3.8)
Total	22/26(84.6)	7/26(26.8)	1/26(3.8)

-\*: not detected.

Seo 등(2007)의 농경지 토양미생물의 분포를 연구한 보고에 따르면 지역에 따라 상이하나, *Bacillus* spp.는 대체적으로  $10^5 \sim 10^6$  CFU/g의 분포 정도를 보이고 1999년 조사에 비해 증가하는 경향을 보였으며 Sung 등(1998)은 토양미생물 분포연구에서 *Bacillus* spp.가 분리된 미생물 가운데 50%를 차지한다고 발표했다. 그리고 Kim 등(2006)의 실험에서 *B. thuringiensis*는 토양에 10%의 분포율을 보이는데 반해, 분리된 쌀겨에서는 더 높은 비율로 나타나 곡류 저장 창고나 방앗간의 먼지에 의한 오염도 원인일 것으로 사료된다(Kim 등1995). 반면, 쌀을 이용한 생식, 선식의 경우 *B. cereus*가  $10^0 \sim 10^3$  CFU/g 정도의 오염도를 나타냈고(Choi 2005; Cho 등 2008), 즉석섭취 편의식품 중 밥류와 빵류 역시  $10^2$  CFU/g 정도를 보였다(Kim 등 2011). 또한 Kim & Goepfert(1971)는 수확한 감자의 표면에는  $10^2 \sim 10^3$  CFU/g, 곡물가루에는  $10^2$  CFU/g 수준의 *B. cereus*가 오염되어 있다고 보고하였으며, Jang & Lee(1980)는 미반류에서의 *B. cereus* 분포를 알아보는 실험에서 전체 101개의 시료 가운데 40개의 시료에서 *B. cereus*가 검출되었고, 밥과 김밥에서는  $10^6$  CFU/g, 떡에서는  $10^4$  CFU/g의 균이 검출되었다고 보고하였다. Chitov 등(2008)은 현미에서 13/31 (41.9%), 곡류분말제품에서 2/6(33.3%), noodle 제품에서 3/16 (18.7%)의 분포도를 보였으며, 전반적으로  $10^2$  CFU/g 정도의 오염도를 보였다고 밝혔다. 그리고 Isara 등(2010)이 fast-food 레스토랑에서 판매되는 음식의 오염도를 조사한 연구에서 *B. cereus*는 salad, fried rice, meat pie, doughnut 등 다양한 식품에서 모두 발견되었다는 보고가 있는 점으로 보아, 제조 공정, 가열, 건조 단계에서 미생물이 일부 제거되지만, 포자 형성에 의해 발아하거나 조리 중 다시 오염되는 것으로 판단된다.

### 3. *B. cereus* Group의 Biofilm 형성 특성

쌀겨와 쌀로부터 분리한 *Bacillus cereus* group을 이용하여 biofilm 형성 특성을 비교하기 위해 *B. cereus* group 표준 균주와 분리 균주들을 10  $\mu$ l TSB 배지에 접종한 후 PVC microtiter plate- 96 well에서 4일간 배양하여 측정하였다(Fig. 3). Microtiter plate에 표준 균주와 분리 균주를 각 200  $\mu$ l씩 분주하여 시간 경과에 따른 biofilm 형성 정도를 spectrophotometer를 이용하여 비교한 결과, 12시간 배양에서는 평균 0.15의 O.D값을 나



**Fig. 3. *B. cereus* group of biofilm formation as incubation time.** No.1, Blank; No.2, *B. cereus* KCCM 40935; No.3, *B. cereus* KCCM 11773; No.4, *B. cereus* KCTC 1094; No.5, *B. thuringiensis* KCTC 1509; No.6, *B. thuringiensis* KCCM 11429; No.7, *B. thuringiensis* KCCM 11428; No.8, *B. mycoides* KCTC 3453; No.9, *B. cereus* B-50B; No.10, *B. cereus* B-38B; No.11, *B. thuringiensis* B-28A; No.12, *B. mycoides* (B-59B)

타냈으나, 24시간 후에는 그 수가 2배 가량 증가했고, 4일째에 대부분 0.4의 O.D값을 나타내어 *B. cereus*가 polyethylene에 부착해 biofilm을 형성한다는 것을 알 수 있었다. 또한 시간이 경과함에 따라 환경 스트레스에 저항하여 생존한 세균이 두터운 층의 biofilm을 형성한다는 것을 확인하였는데, 특히 표준 균주보다 분리 균주에서의 biofilm이 더 강하고 빠르게 형성됨을 알 수 있었다. Elhariry(2011)의 실험에서도 희석된 TSB 배지에서 48시간 배양된 표준 균주는 0.5의 O.D값을 보이나, 분리 균주들은 대체로 0.8을 나타내 비슷한 결과를 확인하였다. 또한 wild type의 그람 양성 세균들 가운데 *Bacillus* spp.는 biofilm 형성 시 많은 EPS(extracellular polymeric substances)를 생성하여 물체의 표면에 단단히 부착한다는 보고가 있어 본 연구 결과와도 일치하며(Kwon 등 2002), *B. cereus* group 가운데 토양에서 유래되거나 소화기관에 질병을 유발하는 균주는 다른 질병을 유발하는 균주에 비해 biofilm 형성 능력이 뛰어나다(Auger 등 2009). Biofilm은 미생물이 영양결핍, 온도 및 pH의 변화, 건조와 같은 스트레스 환경에 적응하기 위해 중합체 matrix 내에서 capsule을 만들어 물체의 표면에 부착하여 형성되며(Costerton 등 1999), 미생물이 고체 표면에 부착(attachment), 생물 막의 성숙(maturation) 및 생물 막에서 이탈(detachment) 단계로 이어지는 메커니즘을 갖는다(Costerton 등 1995; No 등 2009). 또한 이들은 부유 세균과는 다른 유전자 발현을 통해 외부 물리화학적 자극에 대한 저항성이 생겨 제조공정에서 열처리나 살균제 처리에도 쉽게 제거되지 않아 섭취 시 식중독을 유발한다. 특히 *B. cereus*는 영양원이 충분한 경우 2시간에서 18시간 사이에도 biofilm이 형성되므로(Marinda 등 2002) 각별한 주의가 필요하며, 형성장소도 금속, 유리, 식물의 잎사귀 등 다양한 물체의 속성에도 큰 영향이

없는 듯 보인다(Wijman 등 2007). 또한 여러 종류의 세균이 만들어내는 biofilm이 한 종류의 세균으로 이루어진 biofilm 보다 두껍게 형성되며(Lucia 등 2011), 특히 쌀은 저장 시 저장고에 먼지와 부유세균이 많기 때문에 빠르게 biofilm을 형성할 것이라고 사료된다.

#### 4. Biofilm 형성 *B. cereus*의 항생제와 항균제 처리에 따른 특성

Biofilm을 형성하기 위해 glass wool을 이용하였으며, 0.5 g의 glass wool이 첨가된 tryptic soy broth에 *B. cereus* KCCM 40935를 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 0.1% crystal violet으로 염색 후 현미경 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 또한 glass wool에 부착되어 생성된 biofilm과 부유 세균을 분리하여 6종의 항균제와 8종의 항생제가 첨가된 배지에서 생육 최소저해농도를 확인하였다(Table 2). 전반적으로 biofilm을 형성한 cell이 부유 세균에 비해 2배 정도 높은 농도의 항생제에서 생존하여 항생제에 덜 민감한 것으로 나타났으며, cephalothin, streptomycin, tetracycline, lincomycin에서는 biofilm formation cell이 각각 128  $\mu\text{g/ml}$ , 64  $\mu\text{g/ml}$ , 16  $\mu\text{g/ml}$ , 32  $\mu\text{g/ml}$ 로 부유 세균보다 4배가 높은 농도에서도 생육이 가능하였다. 특히 neomycin과 vancomycin에서는 모두 16  $\mu\text{g/ml}$ 로 8배가 높은 농도의 배지에서도 생육하는 것을 확인하였다. 그러나 항균제인 Na(ClO<sub>2</sub>)과 rhamnolipid는 biofilm 형성과 상관없이 부유 세균과 동일한 MIC수치를 나타냈다. *B. cereus*는 대부분  $\beta$ -lactam 계의 항생제에는 내성을 보이거나, imipenem, vancomycin, tetracyclin, chloramphenicol, gentamicin과 같은 non- $\beta$ -lactam 계의 항생제에는 감수성이 있는 것으로 알려져 있다(Weber 등 1988; Kim 등 2011). 그러나 biofilm은 세포 외에 protein, DNA, polysaccharide 등의 다양한 exopolymer로 존재하기 때문에 그 저항성이 증가되어 제어가 어렵고, 식품의 산패나 미생물 배양 시 생성되는 산물로 인한 낮은 pH 환경에서는 세포의 신호전달인 quorum sensing이 향상된다고 밝혔다(Nguyen

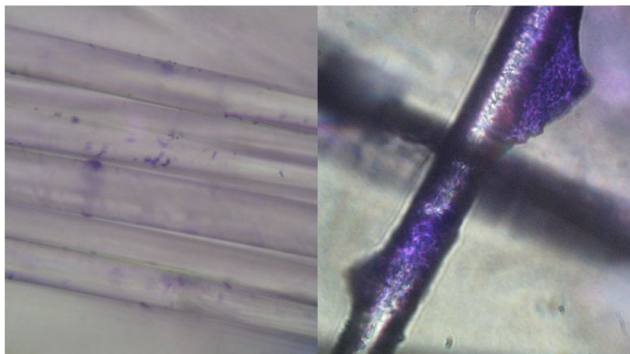


Fig. 4. Biofilm of *B. cereus* on glass wool (A) 3 hr after inoculation and (B) 48 hr after inoculation.

Table 2. MICs resulting from bactericides and antibiotics using *B. cereus* KCCM 40935

Biocide	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Planktonic cell	Biofilm cell
Na(ClO <sub>2</sub> )	2.08	2.08
Acetic acid	66.56	123.12
Lactic acid	66.56	123.12
Ethanol	246.24	246.24
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	33.28	66.56
Rhamnolipid	0.13	0.13
Ampicillin	64	128
Cephalothin	32	128
Neomycin	2	16
Streptomycin	16	64
Vancomycin	2	16
Nalidixic acid	64	128
Tetracycline	4	16
Lincomycin	8	32

등 2011). 또한 *B. cereus* biofilm은 cetyl trimethyl ammonium bromide(CTAB), glutaraldehyde(GLUT)과 같은 항균제에는 민감하지만, 다른 균주와 섞인 biofilm은 저항력을 보인다는 보고가 있으며(Simoes 등 2009), 높은 습도(>or =97%)와 산소접촉이 많은 곳에서 잘 형성하는 특성을 갖는다(Ryu 등 2005). Park 등(2004)은 미생물의 신호전달인 quorum sensing을 교란시켜 차단할 수 있다고 보고한 논문에서 세균의 신호전달물질인 AHL의 길항물질 개발과 효소를 이용하여 신호물질을 분해할 수 있다고 말하였고, Augustine 등(2010)은 *B. cereus* group이 생산하는 AHL lactonase(AiiA)를 이용하여 그람 음성 세균의 biofilm 형성을 억제할 수 있다고 밝혔다. 그러나 그람 양성 세균의 경우 AHL이 아닌 peptide 신호전달물질과 LuxS 계 autoinducer를 사용하기 때문에(Richard 등 2009) 이것에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 한편, Kim 등(2006)은 염소 소독제와 은 화합물을 이용한 biofilm 제어 실험에서 은 화합물을 소독제로 사용하는 경우 생물 막 외부의 EPS 유기물과 쉽게 반응하여 생물 막 내부로 투과할 수 있어 낮은 농도의 처리에도 효과적이라고 보고하였다.

## 요 약

본 연구에서는 서울, 경기, 강원도, 충남 지역의 벼를 수집하여 쌀겨와 현미에서의 *B. cereus* group을 분리하였으며, 분포분석을 통해 작물의 오염 정도를 알아보고, biofilm 형성 시 특성을 연구하였다. *B. cereus*는 총 26개의 시료 가운데 쌀

에서 34.6%, 쌀겨에서 50.0%로 가장 높은 분포도를 나타냈으며, *B. thuringiensis*는 쌀에서 3.9%, 쌀겨에서 23%의 분포를 보였다. 분리된 균주의 biofilm 형성 능력 실험에서는 시간이 지남에 따라 biofilm 형성 정도가 증가하였으며, 표준 균주에 비해 분리 균주가 biofilm 형성 능력이 높은 것으로 나타났다. 또한 biofilm이 형성된 *B. cereus*의 경우 항생제와 항균제 처리에 따른 최소저해농도는 부유 세균에 비해 대체적으로 높은 내성을 나타내는 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 15차 Agenda project(PJ0073872010)의 2011년도 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사합니다.

## 참고문헌

- Auger S, Ramarao N, Faille C, Fouet A, Aymerich S, Gohar M. 2009. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 75:6616-6618
- Augustine N, Kumar P, Thomas S. 2010. Inhibition of *Vibrio cholera* biofilm by AiiA enzyme produced from *Bacillus* spp. *Arch Microbiol* 192:1019-1022
- Buyer JS. 1995. A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. *Appl Environ Microbiol* 61:1839-1842
- Chang HJ, Lee JH. 2009. Prevalence of *Bacillus cereus* from fried rice dishes and monitoring guidelines for risk management. *Korean J Food Cookery Sci* 25:45-54
- Chitov T, Dispan R, Kasinrerker W. 2008. Incidence and diarrheogenic potential of *Bacillus cereus* in pasteurized milk and cereal products in Thailand. *J Food Saf* 28:467-481
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-745
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322
- Drobniewski FA. 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* 6:324-338
- Elhariry HM. 2011. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. *Food Microbiol* 28:1266-1274
- Granum PE, Lund T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* 157:223-228
- Granum PE. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *J Appl Microbiol* 76:61S-66S
- Ham HJ, Kim MS. 2006. *Bacillus* spp. & *B. cereus* isolated in dried marine products. *J Fd Hyg Safety* 21:159-163
- Isara AR, Isah EC, Lofor PVO, Ojide CK. 2010. Food contamination in fast food restaurants in Benin city, Edo state, Nigeria: Implications food hygiene and safety. *Public Health* 124:467-471
- Jeon JH, Park JH. 2010. Toxin gene analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from cooked rice. *Kor J Food Sci Technol* 42:361-367
- Jo MJ, Jeong AR, Kim HJ, Lee NR, Oh SW, Kim YJ, Chun HS, Koo MS. 2001. Microbiological quality of fresh-cut produce and organic vegetables. *Kor J Food Sci Technol* 43:91-97
- Kim DA, Kim JS, Kil MR, Youn YN, Park DS, Yu YM. 2006. Isolation and activity of insect pathogenic *Bacillus thuringiensis* strain from soil. *Kor J Appl Entomol* 45:357-362
- Kim HS, Park HW, Lee DW, Yu YM, Kang SK. 1995. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated in granary dust. *Kor J Appl Entomol* 34:243-248
- Kim HU, Goepfert JM. 1971. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods. *Appl Microbiol* 22:581-587
- Kim HY, Oh SW, Chung SY, Choi SH, Lee JW, Yang JY, Seo EC, Kim YH, Park HO, Yang CY, Ha SC, Shin IS. 2001. An investigation of microbial contamination of ready-to-eat products in Seoul, Korea. *Kor J Food Sci Technol* 43:39-44
- Kim JE, Kim JY, Yoon JY. 2006. Disinfection efficiency of silver disinfectants for biofilm. *J Korean Soc Environ Eng* 28:81-87
- Kim SH, Kim JS, Choi JP, Park JH. 2006. Prevalence and frequency of food-borne pathogens on unprocessed agricultural and marine products. *Kor J Food Sci Technol* 38:594-598
- Kim SR, Lee JY, Lee SH, Ryu KY, Park KH, Kim BS, Yoon YH, Shim WB, Kim KY, Ha SD, Yun JC, Chung DH. 2001. Profiles of toxin genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus*. *Kor J Food Sci Technol* 43:134-141
- Kramer JM, Gillbert RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Food-borne Bacterial Pathogens. Doyle MP (ed). Marcel Dekker: 21-70
- Kwon KK, Lee HS, Jung SY, Yim JH, Lee JH, Lee HK. 2002. Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike. *Kor J Microbiol* 40:

- 260-266
- Lapidus A, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Segurens B, Dossat C, Land ML, Broussolle V, Brillard J, Guinebretiere MH, Sanchis V, Nguen-the C, Lereclus D, Richardson P, Wincker P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem Biol Interact* 171:236-249
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48:1373-1382
- Lee MS, Chang DS. 1980. Distribution and physiological characteristic of *Bacillus cereus* in rice and rice products. *Korean Fish Soc* 13:163-171
- Lee SY, Kim JH, Kim KB, Song EJ, Kim AR, Park SM, Han CS, Ahn DH. 2007. Antimicrobial activities of medicinal herbs and seaweeds extracts against microorganisms isolated from the rice warehouses. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 476-480
- Marinda CO, Bridgitta S, Jacques T, Pascal C, Denise L, Alexander VH, Volker SB. 2002. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during Biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 68:2770-2780
- Mheen, TI, Narasimhan KS, Cheigh HS, Majumder SK. 1982. Studies in the growth and control of storage fungi in stored paddy rice. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 10:297-305
- Nakamura LK. 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48:1031-1035
- Nguyen MD, Daisuke H, Fumihiko T, Toshitaka U. 2011. Control of milk pH reduces Biofilm formation of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paracasei* on stainless steel. *Food Control* 23:215-220
- No AR, Park KS. 2009. Factors that influence biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *Kor J Fish Aquat Sci* 42: 456-460
- Oguntoyinbo FA, Huch M, Cho GS, Schillinger U, Holzapfel W, Sanni A, Franz CM. 2010. Diversity of *Bacillus* species isolated from okpehe, a traditional fermented soup condiment from Nigeria. *J Food Prot* 73:870-878
- Park SK, Ko YD, Kwon SH, Shon MY, Lee SW. 2003. Occurrence of off-odor and distribution of thermophilic bacteria from rice and cooked rice stored at electric rice cooker. *Korean J Food Preservation* 10:70-74
- Park SY, LEE JK. 2004. Bacterial quorum sensing and anti-quorum sensing. *J Microbiol Biotechnol* 32:1-10
- Richard K, Sammer AB, Oliver G, Reto L, Michael O, Marcus T, Regine L. 2009. Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by luxS repression. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4159-4166
- Ryu JH, Beuchat LR. 2005. Biofilm formation and sporulation *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
- Seki T, Chung CK, Mikami H, Oshima Y. 1978. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 28:182-189
- Seong CN, Baik KS, Chun YM, Kim JK, Kim JH. 1998. Distribution and properties of microorganisms in soil of representative vegetation of Mt. Nam. *Korean J Ecol* 21: 703-712
- Simões LC, Lemos M, Araújo P, Pereira AM, Simões M. 2011. The effects of glutaraldehyde on the control of single and dual biofilms of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. *J of Biofouling* 24:337-346
- Simoës M, Simoës LC, Vieira MJ. 2009. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res* 43:229-237
- Suh JS, Noh HJ, Kwon JS, Weon HY, Hong SY. 2010. Distribution map of microbial diversity in agricultural land. *Korean J Soil Sci Fert* 43:995-1001
- Weber DJ, Saviteer SM, Rutala WA, Thomann CA. 1988. *In vitro* susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 32:642-645
- Wijman JG, De Leeuw PP, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. 2007. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl Environ Microbiol* 73:1481-1488
- Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. 1999. Cloning and nucleotide sequence analysis of gyrB of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, and *B. anthracis* and Their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol* 65:1483-1490