

자돈 설사 분변에서 분리한 *Bacillus cereus* BY06의 장 독소 생성 및 항균제 감수성

오위걸 · 노용환 · *안병용*

전북대학교 바이오식품공학과, *전북대학교 한약자원학과

Enterotoxin Productivity and Antimicrobial Susceptibility of *Bacillus cereus* BY06 Isolated from Pigs with Diarrheal Disease

Wei-Jie Wu, Youg-Hwan Rho and *Byung-Yong Ahn*

Dept. of Food Science & Biotechnology, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea

*Dept. of Oriental Medicine Resources, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea

Abstract

The enterotoxin production and antimicrobial susceptibility on hemolytic strains from stools of diarrheal pigs was investigated in this study. Through morphological observation, *gvrB* nucleotide sequence, and API kit analysis, the selected potential pathogenic strain BY06 was identified as *Bacillus cereus*. Because the characteristic of enterotoxin symptoms were widely caused by *Bacillus cereus* strains, a PCR test was carried out in order to check the enterotoxin genes (*hblA*) in this strain. According to the results, this strain was an enterotoxin positive strain containing the *hblA* gene. The minimum inhibitory concentrations of 10 different antimicrobial agents were screened by the agar dilution test, indicating that this strain was resistant to penicillin G and intermediate to erythromycin; however, it susceptible to cephalothin, vancomycin, clindamycin, fusidic acid, gentamicin, ciprofloxacin, tetracycline and rifampin. These results suggest that the *B. cereus* BY06 isolated from pig feces has a potential risk of producing enterotoxin and is resistant to penicillin G, but susceptible to various antimicrobial agents.

Key words: antimicrobial agents, *Bacillus cereus*, enterotoxin, hemolytic, PCR

서 론

최근 식생활 형태의 변화로 인하여 집단 식중독이 지속적으로 발생하고 있으며(Chung 등 2008), 발생 시 원인균을 규명하는 것은 식중독의 확산 방지 및 사후 대책 수립에 있어서 매우 중요하다. 식중독을 유발하는 미생물의 종은 다양한데, 그 중에서 특히 그람 양성균이며 포자를 형성하는 *Bacillus cereus*의 검출 사례로는 유제품, 건조제품, 육류, 된장, 야채, 콩 및 생식제품 그리고 즉석조리식품 등 매우 다양하다(Ham & Kim 2006; Kim 등 2004). *B. cereus*에 의한 식중독은 1950

년 Hauge(1995)가 처음 보고하였으며, 잠복기는 8~13시간으로 복통, 메스꺼움, 물과 같은 설사가 주 증상이다. 그 이후 여러 나라에서 설사와 복통이 주 증상인 *Bacillus cereus*에 의한 설사형 식중독 사례가 많이 보고되고 있다(Kim 등 2005). *Bacillus cereus*는 설사와 구토를 유발하는 두 종류의 독소를 생산하는데, 설사를 유발하는 단백질 독소로는 non-hemolytic enterotoxin(Nhe), hemolytic enterotoxin(Hbl), cytotoxin K(CytK)가 알려져 있고 구토를 유발하는 펩타이드 독소로는 cereulide가 보고되고 있다(From 등 2005; Hansen & Hendriksen 2001; Schoeni & Wong 2005). 이러한 독소에 관한 연구로는 Jeong

* Corresponding author: Byung-Yong Ahn, Dept. of Oriental Medicine Resources, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea. Tel: +82-63-850-0743, E-mail: ahn2002@jbnu.ac.kr

(2008)이 여러 장류에서 분리된 *B. cereus*가 식중독의 원인이 될 수 있는 장 독소를 생성함을 확인하였다. Hwang(2009)은 곡류, 채소 및 과일류 등 다양한 식품에서 *B. cereus*를 분리 후 장 독소 생성 유무와 유전자 및 생화학적 특성을 보고하였으나, 자돈 설사 분변에서 분리한 *B. cereus*에 대하여는 장 독소 생성이 확인된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 돈육으로 인한 식중독 예방에 대한 기초자료를 제공하고자 *hblA*와 *hblD* 유전자의 검출법(Ankolekar 등 2009)을 이용하여 돼지 분변에서 분리한 *B. cereus* 균주에서 설사 유발 용혈 성장 독소(hemolytic enterotoxin) 생성의 유·무 및 항균제 감수성 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 용혈균주의 분리

균주의 분리는 Fricker 등(2007)의 방법에 따라서 실시하였고, 시료는 출혈을 동반하는 돼지 5마리의 설사 분변을 이용하였다. 즉, 돼지 분변 10 g을 멸균수 100 ml에 현탁시킨 후, 한 마리당 2개씩 총 10개의 mannitol egg yolk polymyxin(MYP) agar(Becton Dickinson, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 혼탁한 환과 분홍색 집락을 나타낸 lecithinase 양성 코로니를 분리하였다(Cho 등 2008). 분리된 균주의 생화학적 특성을 조사하기 위해 API 50CHB kit (Biomereux Co., France)를 사용하여 탄수화물 이용능과 생화학적 특성을 시험한 후 APIWEB(apiweb.biomerieux.com)에 입력하여 조사하였다(Lee 등 2006).

2. 혈액 배지에서 Hemolysis 시험

분리된 코로니를 sheep blood agar(아산제약, Korea)에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 β -용혈을 확인하였다(Douglas 등 1994).

3. 균주의 동정

분리된 균주의 *gyrase B*(*gyrB*) 유전자 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 이용하여 동정을 실시하였다. *gyrB* 유전자의 primer인 forward primer(5'-CCC AAG CTT AAC TGC ACT GGG AAA TYG THG AYA AYA G-3') *gyrB135*와 reverse primer(5'-CGG AAT TCG GAT CCA CRT CGG CRT CBG TCA TRA T-3') *gyrB1510*를 제작하였다(Yamada 등 1999; Wu & Ahn 2011). *gyrB* 유전자를 클로닝하기 위한 polymerase chain reaction(PCR) 반응은 Lee 등(2008) 방법에 의해 수행하였다. PCR은 94°C에 4분간 예비가열한 후 94°C에서 1분간 열변성반응, 58°C에서 1분간 재결합반응, 72°C에서 1분간 중합반응의 과정을 30회 반복한 후 72°C에서 10분간

증폭시켰다. 증폭된 DNA 밴드는 agarose gel extraction kit (Intron biotechnology, Korea)를 이용하여 정제하였고, 얻어진 PCR 산물을 통해 염기서열 분석을 코스모진텍 유전자 해석 센터(Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 염기서열 분석을 통하여 얻은 각 균주의 염기서열은 blast network service를 이용하여 NCBI GenBank database의 염기서열과 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였으며, ClustalW multiple sequence alignment 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 분석하였다. 또한, 더 정확하게 결과를 확인하기 위하여 분리된 두 균주의 생화학적 특성을 API 50CHB kit(Biomereux Co., France)를 사용하여 분석하였다. 탄수화물 이용능과 생화학적 특성을 판별하고, APIWEB(apiweb.biomerieux.com)에 입력하여 조사하였다(Lee 등 2006).

4. 장 독소 확인 시험

장 독소 생성의 유무의 확인은 Kim 등(2005)의 방법에 따라서 hemolysin BL(*hblA*) 유전자를 이용하여 PCR법으로 시험하였다. 동정한 균주를 Mueller-Hinton agar(Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 집락을 증류수 50 μ l에 부유시키고, 98°C에서 20분간 가열하여 DNA를 추출하였다. *hblA* 유전자 동정을 위해서 universal primer(forward primer의 서열은 5'-CGG GCG TTC TAG GGC ATA TTG AG-3', reverse primer의 서열은 5'-GCG AGT AGT TTA TTA GGG ATT TTT TTC A-3')를 사용하여 PCR 증폭하였다(Mantynen & Lindstrom 1998). PCR 반응은 94°C에서 5분간 예비가열한 후 94°C에서 45초간 열변성반응, 65°C로 45초간 재결합반응, 72°C에서 45초간 중합반응을 30회 반복한 후, 마지막으로 72°C로 5분간 증폭시켰다. PCR에 의한 증폭산물 5 μ l를 2% agarose gel(Promega, Madison, WI, USA)의 홈에 넣고 20분간 전기영동하여 band 유·무를 확인하였다.

5. 항균제 감수성 시험

분리한 *B. cereus* 균주에 대한 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 항균제 감수성 시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS, 2002) 한천희석법으로 하였다. 항균제는 cephalothin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, penicillin G, rifampin, tetracycline, vancomycin(Sigma, USA), ciprofloxacin(Miles Pharmaceuticals, USA) 및 fusidic acid(Dong Wha, Korea)로 총 10종류를 각 농도별(0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 16 μ g/ml)로 시험하였다. 시험균주 *B. cereus* 집락을 TSB에 혼탁시킨 후, McFarland 0.5관 탁도에 맞추어 10배로 희석한 후 steers replicator를 사용하여 접종하였고, 접종된 평판은 37°C에 18시간 배양 후 MIC를 판정하였다. 항균제 감수성 시험의 정도 관리를 위하여 *Staphylococcus aureus*(ATCC

33591)와 *Escherichia coli*(ATCC 25992)을 동시에 시험하였다 (Kim 등 2008).

결과 및 고찰

1. 분리 균주의 용혈성 확인 및 동정

돼지 분변에서 분리된 *Bacillus*속 균주 13개를 sheep blood agar plate에 37°C에서 24시간 동안 배양한 결과, 용혈성 균주 2종(BY06, BY12)을 분리하였으며, BY06 균주는 β -용혈성을 나타내었다.

*Bacillus*속 중 용혈성을 나타낸 두 균주의 *gyrB* 유전자염기서열에 기초한 분석을 실시한 결과, BY06와 BY12 균주는 *Bacillus cereus*와 99% 및 91%(Table 1)의 유사성을 나타내었

Table 1. The similarity matrix based on the *gyrB* nucleotide sequences of BY06, BY12 and other bacteria

Strain name	Scores of the similarity (%)	
	BY06	BY12
<i>Bacillus</i> sp.	71	68
<i>Bacillus cereus</i>	99	91
<i>Bacillus anthracis</i>	96	90
<i>Bacillus thuringiensis</i>	96	90
<i>Bacillus subtilis</i>	70	70
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i>	96	90
<i>Bacillus licheniformis</i>	70	70
<i>Bacillus pumilus</i>	73	72
<i>Bacillus halodurans</i>	71	68
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	69
<i>Bacillus clausii</i>	69	68
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	87	88

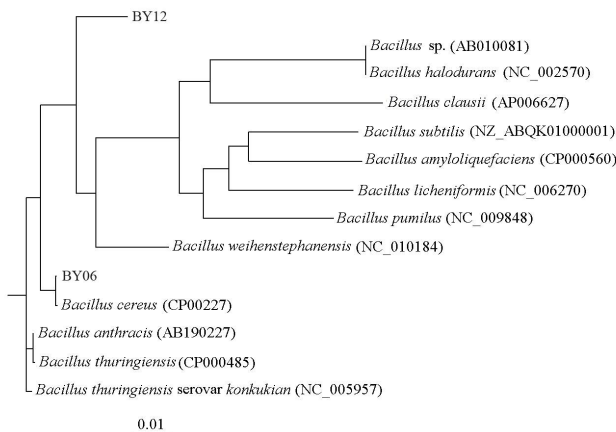


Fig. 1. Phylogenetic tree of *gyrB* gene sequences in BY06, BY12 on the other bacteria.

으며, 이들의 계통분류학적 유연관계를 나타내는 phylogenetic tree는 Fig. 1과 같다. Drancourt 등(2000)의 보고에 의하면 유전자 99%의 상동성을 나타내면 동일한 species로 분류될 수 있으므로, 분리균주 BY06는 *B. cereus* BY06로, BY12은 *Bacillus* spp. BY12로 명명하였다(Fig. 1). API 50CHB kit를 이용한 생화학 테스트 결과, 균주 BY06는 *Bacillus cereus*와 99%의 상동성을, BY12 균주는 *Bacillus cereus*와 85.3%의 상동성을 나타내어(Table 2) *gyrB* 유전자 염기서열에 기초한 분석 결과와 유사함을 확인할 수 있었다.

2. 장 독소 생성 동정을 위한 PCR의 결과

B. cereus BY06와 *Bacillus* spp. BY12의 *hbla* gene segment의 PCR 증폭산물을 agarose gel에 전기영동한 후 band를 통하여 장 독소의 생성 유·무를 확인하였다(Fig. 2). 그 결과, *Bacillus* spp. BY12는 인체에 유해한 장 독소를 생성하지 않았으며, *B. cereus* BY06은 549 bp에서 band가 선명하게 나타난 결과로부터 장 독소를 생성하는 것으로 확인되었다. 이 *hbla* gene은 *B. cereus* 장 독소 생성의 지표물질로 용혈소 BL을 암호화한다. 용혈소 BL은 B성분과 결합하여 세포를 변형시키며, L성분과 함께 세포를 용해시킨다(Kim 등 2005). PCR 결과에 따르면 *B. cereus* BY06는 용혈성 BL을 분비할 수 있는 것으로 보이며, *Bacillus* spp. BY12는 *hbla* band를 포함하지 않아 용혈성 BL을 분비할 수 없는 것으로 보인다. 따라서 두 균주의 용혈성의 type를 다르게 만드는 원인으로 추측되어진다. Mantynen & Lindstrom(1998)는 PCR과 RPLA 키트법에 의한 장 독소 동정시험 결과, *B. cereus*는 62개 종 중 28종(45%)이 양성을 보고하였다. 본 연구에서도 많은 종의 *B. cereus* 균주를 이용하여 장 독소 동정시험을 수행하지 않았으나, 장 독소 생성이 50%의 양성을 나타낸 결과는 Mantynen & Lindstrom(1998)의 결과와 유사한 것으로 사료되는 바이다.

3. B. cereus BY06의 항균제 감수성

β -용혈성과 장 독소를 생성하는 *B. cereus* BY06를 돼지 분변에서 병원성 미생물로 간주하여 이 균주에 대한 항균제 최소억제농도와 항균제 감수성 시험을 실시하였으며, breakpoint를 적용하여 해석한 바 cephalothin, vancomycin, clindamycin, fusidic acid, gentamicin, ciprofloxacin, tetracycline 및 rifampin에 대해서는 감수성, penicillin G에 대해서는 내성을 나타내었다(Table 3). *B. cereus*는 penicillinase 생성균으로 penicillin G에 내성을 나타낸 결과는 대부분의 *B. cereus*에 대한 공통된 결과로 해석된다. Kim 등(2005)은 우리나라 장염환자에서 분리한 *B. cereus* 30개의 균주 중 penicillin G와 cephalothin에 대하여 각각 100%, 73%의 내성을 나타낸 반면, cephalothin, vancomycin, clindamycin, erythromycin, fusidic acid, gentamicin,

Table 2. Biochemical tests of the isolated strains in API 50CHB system

Carbohydrate	BY06 ¹⁾	BY12	Carbohydrate	BY06	BY12
Blank	-	-	Esculin ferric citrate	+	+
Glycerol	-	-	Salicin	-	+
Erythritol	-	-	D-Celliobiose	+	+
D-Arabinose	-	-	D-Maltose	+	+
L-Arabinose	-	-	D-Lactose	+	-
D-Ribose	+	+	D-Melibiose	-	-
D-Xylose	-	-	D-Saccharose (sucrose)	+	+
L-Xylose	-	-	D-Trehalose	+	+
D-Adonitol	-	-	Inulin	-	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	-	D-Melezitose	-	-
D-Galactose	-	-	D-Raffinose	+	-
D-Glucose	+	+	Amidon (starch)	-	-
D-Fructose	+	+	Glycogen	-	-
D-Mannose	+	-	Xylitol	-	-
L-Sorbose	-	-	Gentiobiose	-	-
L-Rhamnose	-	-	D-Turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	+	-	D-Tagatose	-	-
D-Mannitol	+	-	D-Fucose	-	-
D-Sorbitol	-	-	L-Fucose	-	-
Methyl-α-D-mannopyranoside	-	-	D-Arabitol	-	-
Methyl-α-D-glucopyranoside	-	-	L-Arabitol	-	-
N-Acetylglucosamine	-	+	Potassium gluconate	-	-
Amygdalin	+	-	Potassium 2-ketogluconate	-	-
Arbutin	-	+	Potassium 5-ketogluconate	-	-

¹⁾ Symbol denote positive (+) and negative (-).

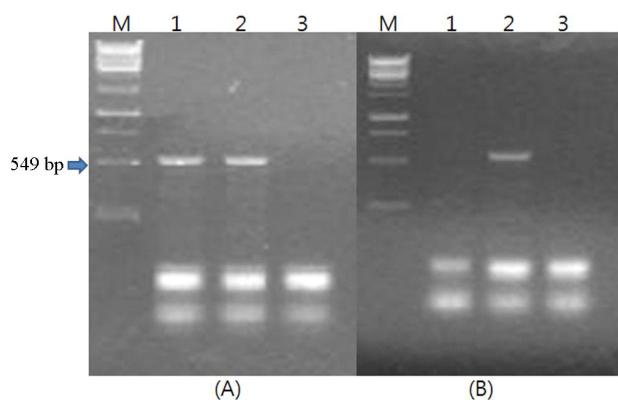


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-generated amplification *B. cereus hblA* segments. Lane M: molecular size marker; Lane 1: *B. cereus* BY06 (A), *Bacillus* spp. BY12 (B); Lane2: enterotoxin-positive control; Lane3: enterotoxin-negative control.

Table 3. Antimicrobial activities on *B. cereus* BY06

Antimicrobial agents	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Susceptibility ¹⁾
Cephalothin	8	S
Vancomycin	2	S
Clindamycin	≤ 0.25	S
Erythromycin	2	I
Fusidic acid	4	S
Gentamicin	≤ 0.25	S
Penicillin G	8	R
Ciprofloxacin	≤ 0.25	S
Tetracycline	0.5	S
Rifampin	≤ 0.25	S

¹⁾ S: susceptible; I: intermediate; R: resistant.

ciprofloxacin, tetracycline 및 rifampin에 대해서는 각각 8~21, ≤ 0.25 ~1, ≤ 0.25 ~1, ≤ 0.25 , 1~4, ≤ 0.25 ~2, ≤ 0.25 , ≤ 0.25 ~2, ≤ 0.25 ~0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 감수성을 나타낸다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 선행 연구자의 연구 결과와 유사하게 B. cereus BY06에 대하여 항생제에 대한 항균 활성은 clindamycin, gentamicin, ciprofloxacin, rifampin에서 상대적으로 높게 나타났다. Lee 등(2002)은 B. cereus에 대하여 linolenic acid가 높은 항균 활성을, Arima 등(2002)은 flavonoid가 B. cereus에 대하여 항균성을 가지며, rutin을 동시에 사용하는 경우 항균 활성을 더 높이는 것으로 보고한 바 있다. 따라서 이와 같은 항생제에 대한 감수성 시험을 추후 수행하고자 한다.

요 약

적리를 동반하는 돼지 분변에서 용혈성 균주를 분리 동정한 후, 장 독소 생성 유·무 및 항생제 감수성 시험을 수행하였다. 분리된 용혈성 균주 B. cereus BY06의 gyrB 유전자 염기서열을 분석한 결과, B. cereus와 99% 유사성을 나타내었다. PCR법에 의한 장 독소 유전자 검출 시험에서 B. cereus BY06는 장 독소 분비 양성으로 판정됨에 따라 설사형 식중독 균임이 확인되었다. B. cereus BY06를 이용한 항균제의 감수성 시험 결과, penicillin G에는 내성을 나타낸 반면 cephalothin, vancomycin, clindamycin, fusidic acid, gentamicin, ciprofloxacin, tetracycline 및 rifampin에 대하여 감수성을 나타냈다. 본 연구를 통해 돼지 분변에서 분리된 B. cereus 균주는 설사를 유발하는 장 독소를 분비하며, penicillin G에 대한 내성을 확인하였다.

References

- Ankolekar C, Rahmati T, Labbe RG. 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int J Food Microbiol* 128:460-466
- Arima H, Ahisda H, Danno G. 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:1009-1014
- Cho YS, Jung EY, Lee MK, Yang CY, Shin DB. 2008. Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from *Sunshik*. *J Fd Hyg Safety* 23:343-347
- Chung JK, Kim MJ, Kee HY, Choi MH, Seo JJ, Kim SH, Park JT, Kim MG, Kim E. 2008. Prevalence of food poisoning bacteria on hands in various age groups. *J Fd Hyg Safety* 23:40-50
- Douglas JB, Amy C, Lee, W. 1994. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl Environ Microbiol* 60:1646-1651
- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38:3623-3630
- Fricker M, Reissbrodt R, Ehling-Schulz M. 2007. Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 121:27-34
- From C, Pukall R, Schumann P, Hormazabal V, Granum PE. 2005. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 71:1178-1180
- Ham HJ, Kim MS. 2006. *Bacillus* spp. & *B. cereus* isolated in dried marine products. *J Fd Hyg Safety* 21:159-163
- Hansen BM, Hendriksen NB. 2001. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl Environ Microbiol* 67:185-189
- Hauge S. 1995. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *J Appl Bacteriol* 18:591-595
- Hwang JY. 2009. Biochemical characteristics and enterotoxin gene distribution of food-borne *Bacillus cereus*. MS Dissertation, Cachon Uni. Seongnam. Korea
- Jeing DY. 2008. Monitoring of *Bacillus cereus* present in traditional fermented soybean products (*Gochujang*, *Deonjang*, *Cheonggukjang*) and its reduction trials. PhD Dissertation, Chonbuk National Uni. Jeonju. Korea
- Kim HJ, Lee DS, Paik HD. 2004. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from raw soybean sprouts. *J Food Prot* 67:1031-1035
- Kim SM, Kim EC, Choi MR, So HA, Shim ES, Kim ES, Park SC, Seong CN, Chong Y. 2008. Cytotoxic distending toxin production, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrhea patient and chickens. *J Bacteriol Virol* 38:207-219
- Kim SM, Kim EC, So HA, Lee GS. 2005. *Bacillus cereus* clinical isolates: Characteristics, enterotoxin production and antimicrobial susceptibility. *Korean J of Clin Lab Sci* 37: 27-34
- Lee JY, Kim YS, Shin DH. 2002. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *J Agric Food Chem* 50:2193-

2199

- Lee NK, Jeon EH, Lee HJ, Cho IJ, Hahm YT. 2006. Isolation, identification, and characterization of *Bacillus* spp. from the traditionally fermented *cheonggukjangs* in the Gyeonggi and the Gangwon provinces. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49:276-280
- Lee NK, Park JW, Cho IJ, Kim BY, Kwon KO, Hahm YT. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from *cheonggukjang* and its antagonistic effect against *Bacillus cereus*. *Korean J Food Sci Technol* 40:669-673
- Mantynen V, Lindstrom K. 1998. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1634-1639
- Schoeni JL, Wong AC. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* 68:636-648
- Wu WJ, Ahn BY. 2011. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* BY01 with high productivity of menaquinone for *cheonggukjang* production. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54:783-789
- Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. 1999. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gryB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microb* 65:1483-1490

접 수 : 2013년 11월 21일
 최종수정 : 2014년 3월 24일
 채 택 : 2014년 4월 3일