KFAS 한국수산과학회지 Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 53(6), 870-877, 2020

Original Article
Korean J Fish Aquat Sci 53(6),870-877,2020

시판 젓갈에서 분리한 *Bacillus cereus*의 독소 유전자 및 항균제 내성 분석

박권삼* · 조의동 · 김희대[1]

군산대학교 식품생명공학과, [1]충북도립대학교 바이오생명의약과

Profiles of Toxin Genes and Antimicrobial Resistance of *Bacillus cereus* Strains Isolated from Commercial Jeotgal

Kwon-Sam Park*, Eui-Dong Cho and Hee-Dai Kim[1]

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea
[1]Department of Biotechnology and Biomedicine, Chungbuk Provincial College, Cheongju 28160, Korea

Twenty-three *Bacillus cereus* strain isolated from commercial jeotgal were investigated for 11 toxin genes and susceptibility to 25 different antimicrobials. The hemolytic enterotoxins *hblA*, *hblC*, and *hblD* were detected in 13.0%, and non-hemolytic enterotoxins *nheA*, *nheB*, and *nheC* were detected in 26.1%, 100%, and 100% of the isolates, respectively. The positive rates of *cytK, entFM, becT, hlyII*, and *ces* were 73.9%, 60.9%, 26.1%, 8.7%, and 0.0%, respectively. According to the disk diffusion susceptibility test, all of the strains studied were resistant to cefuroxime, followed by cefoxitin (78.3%), oxacillin (78.3%), ampicillin (69.6%), penicillin G (69.6%), and amoxicillin (65.2%). However, all the strains were susceptible to 11 other antimicrobials, including amikacin, chloramphenicol, and ciprofloxacin. The average minimum inhibitory concentrations of amoxicillin, ampicillin, and cefuroxime against *B. cereus* were 462.9, 235.0, and 135.0 μg/mL, respectively. These results highlight the need for sanitizing commercial jeotgal, and provide evidence to help reduce the risk of jeotgal contamination by antimicrobial-resistant bacteria.

Keywords: Antimicrobial susceptibility, *Bacillus cereus,* Commercial jeotgals, Minimum inhibitory concentration, Virulence genes

서 론

*Bacillus cereus*는 자연계에 널리 분포하고 있는 그람 양성의 호기성 또는 통성혐기성 간균으로 내열성 포자를 형성하며 식품에 오염되어 식중독을 유발하는 원인세균이다(Bottone, 2010). 이 균에 의한 식중독은 균이 체내에서 증식하는 동안 생성되는 enterotoxin에 의한 설사형과 식품에서 영양 세포 상태로 증식하면서 생성한 emetic toxin에 의한 구토형으로 구별된다. 설사형 식중독은 육류, 채소 스프, 크림, 소시지 등이 원인 식품으로 잠복기가 8-16시간 정도이며, 설사와 복통이 주 증상으로 관련 독소로는 hemolysin BL (Hbl), non-hemolytic enterotoxin (Nhe), cytotoxin K (CytK), enterotoxin FM, hemolysin II (HlyII) 및 enterotoxin T (BceT) 등이 있다. 반면 구토형 식중독은 쌀밥이나 볶음밥이 원인 식품이며 잠복기가 1-5시간 정도로 빠르며 구토와 복통을 유발하는 독소는 emetic toxin (cereulide, CER)이다. 이 독소는 저분자펩타이드로 126°C에서 90분 가열하여도 파괴되지 않은 내열성을 나타내며 산, 알카리, 단백분해효소에도 저항을 가지고 있다(Kramer and Gillbert, 1989; Agata et al., 1995; Fagerlund et al., 2004; Ehling-Schulz et al., 2005; Arnesen et al., 2008; Rajkovic et al., 2008; Gao et al., 2018). 식품의약품안전처 식품안전정보포털의 식중독 통계에 의하면 2010년부터 2019년까지 최근 10년간 우리나라에서 발생한 *B. cereus*에 의한 식중독 사고의 발생건수 및 환자수는 각각 84건 및 1,209명으로 이 균에 의한 식중독 환자수는 건당 평균 14.4명이 발생하여 다른 식중독세균에 비해서는 식중독 발생건수 및 환자수는 낮은 편에 속한다(MFDS, 2020a). 우리나라 식품공전에서 일반 식품의 기준 및 규격에 의하면 *B. cereus*는 장류(메주 제외) 및 소스, 복합조미식품, 김치류, 젓갈

***Corresponding author:** Tel: +82. 63. 469. 1822 Fax: +82. 63. 469. 7448
E-mail address: parkks@kunsan.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licens (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.

https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0870
Korean J Fish Aquat Sci 53(6), 870-877, December 2020
Received 20 October 2020; **Revised** 15 November 2020; **Accepted** 18 November 2020
저자 직위: 박권삼(교수), 조의동(대학원생), 김희대(교수)

Copyright © 2020 The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

류, 절임류, 조림류는 10,000 CFU/g 이하 및 식육(제조, 가공용 원료는 제외한다), 살균 또는 멸균 처리하였거나 더 이상의 가공, 가열 조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 가공식품은 1,000 CFU/g 이하의 기준이 설정되어 있다(MFDS, 2020b).

다양한 시료에서 분리한 *B. cereus*에 대한 독소 유전자 및 항균제 내성에 관한 연구보고는 다수 존재하나(Kim et al., 2011; Kim et al., 2014; Jo et al., 2017; Gao et al., 2018; Yu et al., 2020), 시판젓갈에서 *B. cereus*의 오염 실태에 관한 연구논문은 거의 없는 실정이다. 젓갈은 어류, 갑각류, 연체류 및 극피류 등의 전체 또는 일부분에 식염을 가하여 발효 숙성시킨 것으로 원료 자체에 존재하는 미생물 및 효소작용으로 분해와 숙성되어 독특한 풍미를 가지는 수산발효식품이다. 2019년 염신품의 국내생산량은 80,328톤이며 충남 및 전북에서 생산된 양은 36,947톤 및 2,381톤으로 전체의 46.0% 및 2.96%에 해당된다(KOSIS, 2020). 식품공전에서 젓갈에 대한 기준 및 규격은 타르색소 불검출, 보존료는 식염 함량이 8.0% 이하의 제품에 한하여 소르빈산으로서 1 g/kg 이하로 첨가할 수 있으며, 식중독균(*B. cereus*는 g당 10,000 CFU 이하 및 *Clostridium perfringens*는 n=5, c=2, m=100, M=1,000)에 관한 기준 및 규격이 설정되어 있을 뿐이다(MFDS, 2020b). 따라서 시판 젓갈의 안전성 확보를 위하여 시판젓갈에서 분리한 *B. cereus*의 독소유전자의 보유성 및 항균제 내성에 관한 연구 결과의 축적은 절실히 요구된다. 이를 위하여 시판 젓갈에서 분리한 총 23균주의 *B. cereus*을 대상으로 독소유전자의 보유성, 항균제 내성 양상 및 내성 항균제에 대한 최소발육억제농도를 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

실험에 사용한 *B. cereus*는 2019년 7월 충남 논산시 강경대흥시장 소재의 젓갈 도매점에서 구입한 12종의 젓갈 및 전북에서 부안군 곰소젓갈식품센터의 도매점에서 구입한 12종의 젓갈 총 24종의 시판 젓갈에서 분리한 23균주 및 독소 유전자 유무를 판정하기 위하여 *B. cereus* KCCM 40935 및 NCTC 11143 균주를 사용하였다. 항균제 감수성 정도 관리에는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 균주를 사용하였다. 최소발육억제농도 측정을 위한 각종 항균제는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다.

*B. cereus*의 분리 및 동정

시판 젓갈에서 *B. cereus*의 분리 및 동정은 다음과 같이 실시하였다. 시료 25-30 g에 9배량의 phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na_2HPO_4 and 1.5 mM KH_2PO_4; pH 7.4)을 가하고 2분간 균질화 후 검액은 단계 희석하여 Brilliance Bacillus cereus agar (Oxoid, Hampshire, England)에 단계별 검액 1 mL씩을 3장의 배지에 접종하고 35±1.0°C에서 18시간 배양한 후 녹색 집락을 계수하여 평균하였으며, *B. cereus*로 추정되는 모든 균주는 순수 분리하고 그람 염색 및 API 50CHB kit와 API 20E kit (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 생화학 분석으로 동정하였다. 용혈성 시험은 아산제약㈜ (Hwasung, Korea)에서 생산하는 sheep blood agar plate에 시험균을 접종하여 35±1.0°C에서 18시간 배양 후 용혈능 여부를 확인하였다. 또한 유전학적으로 동정하기 위하여 균주는 trytic soy broth (Merck, Darmstadt, Germany)에 접종하여 35±1.0°C에서 18시간 진탕 배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여 12,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 얻은 균체에 멸균 증류수 100 μL을 가하여 현탁 후 100°C에서 10분 가열하고 얼음에 2분간 정치 후 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 PCR (polymerase chain reaction) assay를 위한 template DNA로 사용하였다. 유전자 증폭을 위한 각종 효소는 Takara (Otsu, Japan)사의 제품을 사용하였으며, PCR 조건은 *B. cereus*의 *gyrB*를 표적 유전자로 하여 94°C 5분간 1회 열 변성 후 94°C에서 30초, 63°C에서 30초 및 72°C에서 30초를 한 단위로 하여 이를 30회 수행하고, final extension은 72°C에서 5분간 실시하였다(Park et al., 2007). PCR은 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며 증폭된 DNA 산물 10 μL를 1.5% agarose gel에 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4, Marne-la-Vallée, France)사 Gel-Doc system으로 DNA 증폭 여부를 확인하였다. 동정이 완료된 *B. cereus*는 최종 농도 15%가 되도록 멸균된 글리세린을 첨가하여 cryovial storage box (Simport, Beloeil QC, Canada)에 넣어 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

독소 유전자의 분석

*B. cereus*의 11종 독소 유전자의 분석에 사용한 primers의 염기서열, 증폭 DNA 크기 및 annealing 온도 등은 Table 1에 나타내었으며, primers는 Bioneer (Daejon, Korea) 사에 의뢰 합성하였다. 사용한 template DNA는 동정에 사용한 것과 동일한 것을 사용하여 분석하였으며, PCR 조건은 94°C 5분간 1회 열 변성 후 94°C에서 30초 열 변성 및 신장 시간은 증폭 산물이 1 kb 이상인 경우에는 2분을 1 kb 이하인 경우에는 1분간 실시하였다. 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4)사 Gel-Doc system으로 확인하였다.

항균제 감수성 시험

각종 항균제에 대한 분리 균주의 감수성은 Becton Dickinson (BBL Sensi-Disk, Sparks, MD, USA)사의 항균제 디스크 제품을 사용하여 Acar and Goldstein (1991)의 디스크확산법으로 시험하였다. Trytic soy broth (Merck)에 시험 균주를 접종하여 35±1.0°C에서 하룻밤 진탕 배양 후 멸균 생리식염수로 2회 세정하고 농도를 McFarland No. 0.5로 조정하여 두께 0.4

mm의 Mueller Hinton agar (Difco, Sparks, MD, USA) 평판에 균을 도말 하였다. 여기에 검사 항균제 디스크를 고착하여 35±1.0℃에서 16시간 배양 후 각 항균제에 의해 형성된 생육저지환의 크기를 측정하고 표준 지표에 따라 감수성 여부를 평가하였다. 시험 항균제는 amikacin (30 μg), ampicillin (10 μg), amoxicillin (25 μg), cefotaxime (30 μg), cefoxitin (30 μg), cefuroxime (30 μg), ceftriaxone (30 μg), cephalothin (30 μg), cephazolin (30 μg), chloramphenicol (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), clindamycin (2 μg), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), kanamycin (30 μg), nalidixic acid (30 μg), nitrofurantoin (100 μg), norfloxacin (10 μg), oxacillin (1 μg), penicillin G (10 μg), rifampin (5 μg), streptomycin (10 μg), tetracycline (30 μg), ticarcillin (75 μg), 및 vancomycin (30 μg) 등 25종의 항균제 디스크를 사용하였다. MAR index는 내성을 나타내는 항균제 수를 실험에 사용한 전체 항균제 수로 나눈 값으로 계산하였다.

최소발육억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)의 측정

최소발육억제농도는 미국 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002)에 기초하여 변법으로 측정하였다. 멸균된 Mueller Hinton broth (Difco)에 2,048 μg/mL에서 1 μg/mL까지 절반씩 농도를 달리한 항균제를 첨가한 후 멸균된 소형시험관에 각 농도의 항균제가 첨가된 배지를 2 mL씩 분주하였다. Trytic soy broth (Merck)에서 하룻밤 전 배양한 시험균액 3 μL을 접종하여 35±1.0℃에서 16시간 정치 배양한 후 균 증식 여부는 육안으로 확인하여 최소발육억제농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

시판 젓갈에서 *B. cereus*의 분리 및 동정

시판 젓갈에서 *B. cereus*의 오염 정도를 파악하기 위하여 2020년 7월 충남 논산시 강경대흥시장 소재의 젓갈 도매점 및 전북 부안군 곰소젓갈식품센터의 도매점에서 소비량이 많다고 판단되는 젓갈 각 12종(낙지젓, 오징어젓, 새우젓, 갈치속젓, 어리굴젓, 명란젓, 꼴뚜기젓, 창란젓, 조개젓, 밴댕이젓, 갈치순태젓 및 가리비젓) 총 24종의 젓갈을 구입하여 분석하였다. 그 결과 강경대흥시장에서 구입한 시료의 경우는 갈치속젓(30 CFU/g), 꼴뚜기젓(10 CFU/g), 조개젓(30 CFU/g) 및 가

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
BCJH	5'-TCATGAAGAGCCTGTGTACG-3' 5'-CGACGTGTCAATTCACGCGC-3'	475	63	Park et al., 2007
HblA	5'-GTGCAGATGTTGATGCCGAT-3' 5'-ATGCCACTGCGTGGACATAT-3'	320	55	Hansen and Hendriksen., 2001
HblC	5'-AATGGTCATCGGAACTCTAT-3' 5'-CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT-3'	750	55	Hansen and Hendriksen., 2001
HblD	5'-AATCAAGAGCTGTCACGAAT-3' 5'-CACCAATTGACCATGCTAAT-3'	430	55	Hansen and Hendriksen., 2001
NheA	5'-TACGCTAAGGAGGGGCA-3' 5'-GTTTTTATTGCTTCATCGGCT-3'	500	55	Hansen and Hendriksen., 2001
NheB	5'-CTATCAGCACTTATGGCAG-3' 5'-ACTCCTAGCGGTGTTCC-3'	770	55	Hansen and Hendriksen., 2001
NheC	5'-CGGTAGTGATTGCTGGG-3' 5'-CAGCATTCGTACTTGCCAA-3'	583	55	Hansen and Hendriksen., 2001
BceT	5'-CGTATCGGTCGTTCACTCGG-3' 5'-GTTGATTTTCCGTAGCCTGGG-3'	661	55	Hansen and Hendriksen., 2001
CytK	5'-AAAATGTTTAGCATTATCCGCTGT-3' 5'-ACCAGTTGTATTAATAACGGCAATC-3'	238	55	Oltuszak-Walczak and Walczak, 2013
Hly II	5'-GATTCTAAAGGAACTGTAG-3' 5'-GGTTATCAAGAGTAACTTG-3'	867	50	Fagerlund et al., 2004
EntFM	5'-ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG-3' 5'-TTAGTATGCTTTTGTGTAACC-3'	1,269	60	Asano et al., 1997
Ces	5'-GGTGACACATTATCATATAAGGTG-3' 5'-GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA-3'	1,271	58	Ehling-Schulz et al., 2005

BCJH, primers targeting *Bacillus cereus*; Hbl, hemolysin BL; Nhe, non hemolytic enterotoxin; BceT, *Bacillus cereus* toxin; CytK, cytotoxin; Hly, hemolysin; EntFM, enterotoxin FM; Ces, cereulide synthetase.

리비젓(10 CFU/g)에서, 곰소젓갈식품센터에서 구입한 시료에서는 오징어젓(40 CFU/g), 갈치속젓(100 CFU/g) 및 가리비젓(10 CFU/g)에서 *B. cereus*가 검출되었다. 식품공전에서 제시하는 젓갈류에 대한 *B. cereus*의 기준인 10,000 CFU/g 이하를 초과한 제품은 없었으나 두 곳 구입처의 시료에서 공히 검출된 갈치속젓과 가리비젓은 다른 젓갈에 비해 *B. cereus*의 오염은 높은 것으로 판단된다. 분리된 *B. cereus*의 동정은 키트를 사용한 생화학적 시험 및 유전학적 방법 즉, PCR assay에 의한 *gyrB* 유전자의 존재 유무로 동정하였다(Park et al., 2007). 생화학적 시험에서는 *B. cereus*로 동정되었지만, *gyrB* 유전자의 증폭이 확인되지 않은 3균주는 실험에서 배제하고 23균주를 대상으로 추후 실험에 사용하였다. 용혈능 시험에서 모든 균주는 균체 주위에 β-용혈능을 나타내는 균주로 판별되었다(결과 미제시).

*B. cereus*의 독소 유전자 분석

시판 젓갈에서 분리한 *B. cereus*의 23균주에 대해 10종류의 enterotoxin (*hblA*, *hblC, hblD, nheA, nheB, nheC, entFM, becT, hlyII,* 및 *cytK*) 및 1종류의 emetic toxin (*ces*) 유전자 총 11종류 독소유전자의 유무는 PCR assay로 분석하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 독소유전자의 보유 양상은 2종류에서 8종류의 독소유전자를 보유하여 총 10개 그룹으로 분류되었다. NHE (non haemolytic enterotoxin) complex (*nheA*, *nheB*, *nheC*) 중 3개의 *nhe* 유전자 모두를 보유한 균주는 6균주(26.1%)이며, *nheB*와 *nheC* 유전자를 동시에 보유하는 균주는 23균주(100%)이었다. 또한 HBL (hemolysin BL) complex (*hblA, hblB, hblD*) 중 3개의 *hbl* 유전자 모두를 보유한 균주는 3균주(13.0%)이며 나머지 20균주(87.0%)는 HBL complex 중 어느 유전자도 보유하지 않았다. 6종류(*nheB, nheC*, *entFM, becT, cytK, EM*)의 독소유전자를 보유하고 있는 type 8이 5균주(21.7%)로 가장 높은 빈도를 나타내며, 3종류의 독소유전자(*nheB, nheC, cytK*)를 보유하고 있는 type 2가 4균주(17.4%)로 다음이었다. 독소유전자별 보유율은 *nheB* (100%), *nheC* (100%), *cytK* (73.9%), *entFM* (60.9%), *nheA* (26.1%), *becT* (26.1%), *hblA* (13.0%), *hblC* (13.0%), *hblD* (13.0%), *hlyII* (8.7%), 및 구토 유전자(*ces*)는 모든 균주에서 검출되지 않았다. 결과적으로 시판 젓갈에서 분리한 *B. cereus* 균주의 주요 독소유전자는 *nheB, nheC*, *cytK*, 및 *entFM*인 것으로 확인되었다. 저온살균 우유에서 분리한 *B. cereus*에서 HBL complex와 NHE complex 독소유전자는 45.0%와 93.0%가 검출되었으며, *cytK*, *entFM*, *becT*, *hlyII*, 및 *cesB* 독소유전자는 각각 73.0, 96.0, 75.0, 54.0, 및 5.0%를 보유하고 있었다는 결과와는 독소유전자의 보유율에서 차이를 보였다(Gao et al., 2018). 즉석·편이식품류에서 분리한 *B. cereus* 263균주를 대상으로 독소유전자를 분석한 결과, NHE complex (*nheA*, *nheB*, *nheC*) 중 3개 *nhe* 유전자 모두를 보유한 균주는 89.7%, *nheA* 만을 보유한 균주는 0.8%였으며, HBL complex (*hblA, hblB, hblD*) 중 3개 *hbl* 유전자 모두를 보유한 균주는 66.5%, 1-2개 유전자를 가진 균주는 21.7% 및 어느 유전자도 보유하지 않은 균주는 11.0%, 독소 *entFM, cytK*, *becT*, 및 구토 독소 CER 유전자의 검출율은 100, 100, 43.0, 및 50.2%이였다는 연구결과(Kim et al., 2014)와 비교해도 시판 젓갈에서 분리한 *B. cereus* 균주의 독소 유전자 보유성과는 차이가 많은 것으로 확인되었다. 또한, 약수터 음용도구에서 분리된 *B. cereus*의 주요 독소유전자는 *nheA*와 *entFM*였다는 결과(Jo et al., 2017) 및 들깻잎과 들깻잎 생산 환경 유래의 *B. cereus*에서 가장 빈번하게 검출되는 독소유전자는 *nheA* (100%), *entFM* (100%), *hblA, C, D* (66.5%), 및 *EM* (21.0%)이 검출되었다는 결과와도 차이가 있었다(Kim et al., 2011). 이러한 결과의 차이는 *B. cereus*의 분리원, 분리 시기 및

Table 2. Toxigenic patterns of *Bacillus cereus* strains isolated from commercial jeotgal

Toxigenic type	No. of strains	Enterotoxin										Emetic toxin
		hblA	*hblC*	*hblD*	*nheA*	*nheB*	*nheC*	*entFM*	*becT*	*hlyII*	*cytK*	*ces*
1	2	-[1]	-	-	-	+[2]	+	-	-	-	-	-
2	4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
3	2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
4	3	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
5	1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
6	2	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
7	1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
8	5	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
9	2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
10	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Detection rate (%)		13.0	13.0	13.0	26.1	100	100	60.9	26.1	8.7	73.9	0.0

[1]-, negative. [2]+, positive. *hbl*, hemolysin BL; *nhe*, non hemolytic enterotoxin; *entFM*, enterotoxin FM; *bceT*, *Bacillus cereus* toxin; *hly*, hemolysin; *cytK*, cytotoxin; *ces*, cereulide synthetase.

분리 장소 등이 다르다는 점이 원인으로 분석된다.

*B. cereus*의 항균제 내성 분석

시판 젓갈에서 분리한 *B. cereus*의 23균주를 대상으로 25종의 항균제에 대한 감수성 분석은 디스크확산법으로 측정하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 25종의 항균제 중 14종의 항균제에는 23균주 전부 또는 일부 균주에서 내성을 나타낸 반면, amikacin, chloramphenicol, 및 ciprofloxacin 등 나머지 11종의 항균제에는 감수성을 나타내었다. 내성율이 높은 항균제는 cefuroxime (100%), cefoxitin (78.3%), oxacillin (78.3%), ampicillin (69.6%), penicillin G (69.6%), amoxicillin (65.2%), ticarcillin (65.2%), cefotaxime (47.8%), ceftriaxone (47.8%), cephazolin (43.5%), streptomycin (39.1%), nalidixic acid (30.4%), cephalothin (26.1%), 및 kanamycin (8.7%) 순서였다. 들깻잎과 들깻잎 생산환경에서 분리한 200주 *B. cereus*의 항생제에 대한 내성은 β-lactam계 항균제인 ampicillin (100.0%), penicillin G (100.0%), oxacillin (94.9%), cefazolin (78.2%), 및 비 β-lactam계 항생제 rifampicin (58.0%)에서 내성이 높았다는 결과(Kim et al., 2011) 및 저온살균 우유에서 분리한 *B. cereus*의 항균제에 대한 내성은 ampicillin (99.0%), penicillin G (99.0%), cefoxitin (95.0%), 및 cephalothin (69.0%) 등의 β-lactam계 항균제에서 내성율이 높았다는 결과(Gao et al., 2018)에 비해서는 약간 낮은 수준으로 확인되었으나 비 β-lactam계 항균제보다 β-lactam계 항균제에서 대체로 내성율이 높다는 결과는 일치하였다. *B. cereus*가 β-lactam계 항균제에 내성율이 높은 이유는 β-lactam계 항균제를 분해하는 β-lactamase를 생산하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 실험에 사용한 23균주에 대한 항균제 내성 양상에 관한 결과는 Table 4에 나타내었다. 항균제 내성 양상은 1종에서 12종까지 다양한 조합의 내성 양상을 나타내고 있는데 cefuroxime에만 내성을 나타내는 균주는 2균주(8.7%)로 multiple antimicrobial resistance (MAR) index는 0.04로 매우 낮았다. Cefurox-

Table 3. Antimicrobial susceptibility and resistance of *Bacillus cereus* isolated from commercial jeotgal

Antimicrobials	Disc content (μg)	No. of isolates		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin (AK)	30	0	0	23
Amoxicillin (AML)	25	15	3	5
Ampicillin (AMP)	10	16	0	7
Cefotaxime (CTX)	30	11	0	12
Cefoxitin (FOX)	30	18	0	5
Cefuroxime (CXM)	30	23	0	0
Ceftriaxone (CRO)	30	11	0	12
Cephalothin (KF)	30	6	0	17
Cephazolin (KZ)	30	10	2	11
Chloramphenicol (C)	30	0	0	23
Ciprofloxacin (CIP)	5	0	0	23
Clindamycin (CC)	2	0	0	23
Erythromycin (E)	15	0	0	23
Gentamicin (GN)	10	0	0	23
Kanamycin (K)	30	2	9	12
Nalidixic acid (NA)	30	7	0	16
Nitrofurantoin (F)	100	0	0	23
Norfloxacin (NOR)	10	0	0	23
Oxacillin (OX)	1	18	0	5
Penicillin G (P)	10	16	2	5
Rifampicin (RD)	5	0	0	23
Streptomycin (S)	10	9	14	0
Tetracycline (TE)	30	0	0	23
Ticarcillin (TIC)	75	15	1	7
Vancomycin (VA)	30	0	0	23

ime와 ceftriaxone 조합 또는 cefuroxime와 kanamycin 조합, 즉 2종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 1균주 및 2균주이며 MAR index는 0.08이었다. Ceftriaxone-cefotaxime-cefuroxime-cefoxitin-oxacillin-penicillin G의 6종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 1균주이며, 7종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 2균주, 8종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 5균주, 9종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 1균주, 10종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 3균주, 11종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 2균주 및 12종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 4균주로 파악되었다. Amoxicillin-ampicillin-cefuroxime-cefoxitin-nalidixic acid-oxacillin-penicillin G-ticarcillin의 8종의 항균제 조합 및 amoxicillin-ampicillin-ceftriaxone-cefotaxime-cefuroxime-cefoxitin-cephalothin-cephazolin-oxacillin-penicillin G-streptomycin-ticarcillin의 12종의 항균제 조합이 공히 4균주씩 검출되어 가장 빈도가 높은 조합이었으며, MAR index는 각각 0.32 및 0.48로 나타났다. 결과적으로 23균주 중 5균주만이 2종 이하의 항균제에 내성을 갖는 반면 나머지 18균주는 최소 6종 이상의 항균제에 내성을 갖고 있다는 점에서 다제내성의 심각성은 대두될 것으로 판단된다. 본 실험에 사용한 젓갈 분리 23균주 *B. cereus*의 항균제 내성 양상이 매우 다양한 이유에 대해서는 정확히 설명하기는 어려우나 일차적으로 판단할 수 있는 가능성은 분리한 시료의 차이에 있다고 판단된다.

내성 항균제에 대한 *B. cereus*의 최소발육억제농도 측정

내성을 나타내는 14종의 항균제에 대한 *B. cereus*의 최소발육억제농도를 측정한 결과는 Table 5에 나타내었다. Amoxicillin에 내성을 나타내는 15균주의 MIC는 32-1,024 μg/mL (평균 462.9 μg/mL)이며 균주에 따른 MIC 차이는 큰 편이며, 대체로 고도 내성을 나타내고 있었다. 감수성을 나타내는 나머지 8균주의 MIC는 <1-16 μg/mL 수준으로 측정되었다. Ampicillin에 내성을 나타내는 16균주의 MIC는 16-512 μg/mL 수준으로 평균 MIC는 235.0 μg/mL이며, 감수성을 나타내는 7균주의 MIC는 <1-8 μg/mL 수준으로 측정되었다. 11균주에서 내성을 나타내는 cefotaxime의 평균 MIC는 32.0 μg/mL이며, 18균주에서 내성을 나타내는 cefoxitin의 평균 MIC는 146.0 μg/mL이었다. 모든 균주에서 내성을 나타내는 cefuroxime는 32-256 μg/mL 범위로 측정되었으며 평균 MIC는 135.0 μg/mL이었다. 11균주에서 내성을 나타내는 ceftriaxone은 32-128 μg/mL 범위로 측정되었으며, 평균 MIC는 43.6 μg/mL이었다. Cephalothin, cephazolin, kanamycin, nalidixic acid, 및 streptomycin에 내성을 나타내는 균주의 평균 MIC는 37.3, 41.6, 32.0, 32.0, 및 16.0 μg/mL로 측정되었다. 또한, 18균주에서 내성을 나타내는 oxacillin은 32-128 μg/mL 범위이며, 평균 MIC는 101.3 μg/mL로 측정되었으며, 감수성 균주의 MIC는 <1 μg/mL 이하였다. 16균주에서 내성을 나타내는 penicillin G에 대한 내성은 16-1,024 μg/mL 범위로 평균 MIC는 332.0 μg/mL로 측정되었으며, 감수성 균주의 MIC는 <1-8 μg/mL 수준이었다. 15균주에서 내성을 나타내는 ticarcillin에 대한 내성은 256-512 μg/mL 범위로 평균 MIC는 341.3 μg/mL로 측정되었으며, 감수성 균주의 MIC는 <1-64 μg/mL 수준이었다. 결과적으로 시

Table 4. Antimicrobial resistance patterns and multiple antimicrobial resistance (MAR) indices of *Bacillus cereus* isolated from commercial jeotgal

Antimicrobial resistant pattern	No. of resistant strains	MAR index
CXM	2	0.04
CXM-CRO	1	0.08
CXM-K	2	0.08
CRO-CTX-CXM-FOX-OX-P	1	0.24
CRO-CTX-CXM-FOX-KZ-OX-S	1	0.28
AML-AMP-CXM-FOX-NA-OX-TIC	1	0.28
AML-AMP-CXM-FOX-NA-OX-P-TIC	4	0.32
AMP-CRO-CTX-CXM-FOX-OX-P-S	1	0.32
AML-AMP-CXM-FOX-NA-OX-P-S-TIC	1	0.36
AML-AMP-CTX-CXM-FOX-KZ-OX-P-S-TIC	1	0.40
AML-AMP-CXM-FOX-KZ-NA-OX-P-S-TIC	1	0.40
AML-AMP-CRO-CTX-CXM-FOX-KZ-OX-P-TIC	1	0.40
AML-AMP-CRO-CTX-CXM-FOX-KF-KZ-OX-P-TIC	2	0.44
AML-AMP-CRO-CTX-CXM-FOX-KF-KZ-OX-P-S-TIC	4	0.48
Total	23	

AML, amoxicillin; AMP, ampicillin; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; FOX, cefoxitin; K, kanamycin; KF, cephalothin; KZ, cephazolin; NA, nalidixic acid; OX, oxacillin; P, penicillin G; S, streptomycin; TIC, ticarcillin.

Table 5. Minimum inhibitory concentration of *Bacillus cereus* isolated from commercial jeotgal

(μg/mL)

Antimicrobials	<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024
Amoxicillin	5 (21.7%)				1 (4.3%)	2 (8.7%)	1 (4.3%)			3 (13.0%)	10 (43.5%)	1 (4.3%)
Ampicillin	5 (21.7%)			1 (4.3%)	1 (4.3%)	1 (4.3%)	1 (4.3%)	6 (26.1%)	2 (8.7%)		6 (26.1%)	
Cefotaxime						12 (52.2%)	11 (47.8%)					
Cefoxitin						5 (21.7%)	2 (8.7%)	6 (26.1%)	3 (13.0%)	7 (30.4%)		
Cefuroxime							5 (21.7%)	6 (26.1%)	4 (17.4%)	8 (34.8%)		
Ceftriaxone						12 (52.2%)	9 (39.1%)	1 (4.3%)	1 (4.3%)			
Cephalothin	5 (21.7%)				6 (26.1%)	6 (26.1%)	5 (21.7%)	1 (4.3%)				
Cephazolin	5 (21.7%)			1 (4.3%)	5 (21.7%)	2 (8.7%)	7 (30.4%)	3 (13.0%)				
Kanamycin				5 (21.7%)	7 (30.4%)	9 (39.1%)	2 (8.7%)					
Nalidixic acid			1 (4.3%)		14 (60.9%)	1 (4.3%)	7 (30.4%)					
Oxacillin	5 (21.7%)						1 (4.3%)	6 (26.1%)	11 (47.8%)			
Penicillin G	5 (21.7%)				2 (8.7%)		2 (8.7%)		7 (30.4%)	3 (13.0%)	1 (4.3%)	3 (13.0%)
Streptomycin					14 (60.9%)	9 (39.1%)						
Ticarcillin	2 (8.7%)		3 (13.0%)			2 (8.7%)		1 (4.3%)		10 (43.5%)	5 (21.7%)	

판 젓갈에서 분리한 23균주의 *B. cereus*는 amoxicillin, ticarcillin, penicillin G, ampicillin, cefoxitin, 및 cefuroxime 등의 항균제에 대해서는 MIC가 100.0 μg/mL 이상으로 대체로 높은 반면 streptomycin, kanamycin, nalidixic acid, cefotaxime, 및 cephalothin 등의 항균제에 대한 MIC는 40.0 μg/mL 이하로 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다(Table 5). 임상 및 식품에서 분리한 *B. cereus*의 내성 항균제에 대한 MIC는 ampicillin (48-256.0 μg/mL), gentamicin (0.19-1.5 μg/mL), penicillin (4.6-18.75 μg/mL), vancomycin (1.5-16.0 μg/mL), clindamycin (0.125-1.0 μg/mL), 및 erythromycin (0.047-4.0 μg/mL)이였다는 결과(Torkar and Seme, 2009) 및 혈액배양에서 분리한 *B. cereus*의 내성 항균제에 대한 MIC는 ampicillin (4->128.0 μg/mL), clindamycin (0.125-1.0 μg/mL), gentamicin (0.125-1.0 μg/mL), levofloxacin (<0.125-32.0 μg/mL), 및 vancomycin (0.5-2.0 μg/mL)이였다는 결과(Horii et al., 2011)와는 차이가 있었다. 그 이유는 본 실험에서는 액체 배지를 사용하여 측정한 반면 기존의 두 결과는 액체 배지가 아닌 고체 배지를 이용한 Etest에 의한 방법으로 측정하였기 때문에 결과에서 차이가 있었다고 판단된다. 시판 젓갈의 안전성 평가를 위하여 다양한 시판 젓갈에서 식중독 원인 세균인 *B. cereus* 23균주를 분리하여 독소 유전자 및 항균제 내성에 대해 검토한 결과, 주요 독소 유전자는 *nheB, nheC*, *cytK,* 및 *entFM*인 것으로 확인되었다. 또한 cefuroxime를 포함한 14종의 항균제에 내성을 나타내며, amoxicillin, ticarcillin, penicillin G, 및 ampicillin 등의 항균제에 대해서는 높은 MIC를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 시판 젓갈의 안전성 확보를 위해서는 젓갈의 위생적인 제조, 유통 및 판매 등이 요구되며, *B. cereus*를 포함한 병원성 세균 및 바이러스의 꾸준한 모니터링도 필요하다고 판단된다.

사 사

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(RF-2017R1D1A3B03034975).

References

Acar JF and Goldstein FW. 1991. Disk susceptibility test. In: Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian V, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 17-52.

Agata N, Ohta M, Arakawa Y and Mori M. 1995. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. Microbiology 141, 983-988. https://doi.org/10.1099/13500872-141-4-983.

Arnesen LPS, Fagerlund A and Granum PE. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 32, 579-606. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x.

Asano SI, Nukumizu Y, Bando H, Lizuka T and Yamamoto T. 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 63, 1054-1057. https://doi.org/10.1128/AEM.63.3.1054-1057.1997.

Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev 23, 382-398. https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09.

Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märtlbauer E and Scherer S. 2005. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 71, 105-113. https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.105-113.2005.

Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy SP and Granum PE. 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. Microbiology 150, 2689-2697. https://doi.org/10.1099/mic.0.26975-0.

Gao T, Ding Y, Wu Q, Wang J, Zhang J, Yu S, Yu P, Liu C, Kong L, Feng Z, Chen M, Wu S, Zeng H and Wu H. 2018. Prevalence, Virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China. Front Microbiol 9:533. https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2018.00533.eCollection 2018.

Hansen BM and Hendriksen NB. 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl Environ Microbiol 67, 185-189. https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.185-189.2001.

Horii T, Notake S, Tamai K and Yanagisawa H. 2011. *Bacillus cereus* from blood cultures: virulence genes, antimicrobial susceptibility and risk factors for blood stream infection. FEMS Immunol Med Microbiol 63, 202-209. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00842.x.

Jo AH, Choi HN, Heo DB, Kwon SM and Kim JB. 2017. Prevalence and toxin characteristics of *Bacillus cereus* isolated from drinking cups in spring. J Food Hyg Saf 32, 50-56. https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.1.50.

Kim SE, Lee JY, Lee SH, Ryu KY, Park KH, Kim BS, Yoon YH, Shim WB, Kim KY, Ha SD, Yun JC and Chung DH. 2011. Profiles of toxin genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from perilla leaf and cultivation areas. Korean J Food Sci Technol 43, 134-141. https://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.2.134.

Kim TS, Kim MJ, Kang YM, Oh G, Choi SY, Oh MS, Yang YS, Seo JM, Ryu MG, Kim ES, Ha DR and Cho BS. 2014. Molecular characterization and toxin profile of *Bacillus cereus* strains isolated from ready-to-eat foods. Korean J Food Sci Technol 46, 334-340. https://doi.org/10.9721/KJFST.2014.46.3.334.

KOSIS (Korean Statistics Information Service). 2020. Seafood statistics. Retrieved from https://kosis.kr/statisticsList/statisticsListIndex.do?menuId=M_01_01&vwcd=MT_ZTITLE&parmTabId=M_01_01#SelectStatsBoxDiv on Nov 17, 2020.

Kramer JM and Gillbert RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Food-born bacterial pathogens. Doyle MP (ed). Marcel Dekker, New York, NY, U.S.A., 21-70.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2020a. Food poisoning statistics. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=3732&menu_grp=MENU_NEW02 on Oct 5, 2020.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2020b. Food code. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=12 on Oct 6, 2020.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement M100-S12. Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 19087-19098.

Oltuszak-Walczak E and Walczak P. 2013. PCR detection of *cytK* gene in *Bacillus cereus* group strains isolated from food samples. J Microbiol Methods 95, 295-301. https://doi.org/ 10.1016/j.mimet.2013.09.012. Epub 2013 Sep 20.

Park SH, Kim HJ, Kim JH and Kim TW. 2007. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. J Microbiol Biotechnol 17, 1177-1182.

Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, in 't Veld P, Denon Q, Vérhe R and Debevere J. 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Lett Appl Microbiol 46, 536-541. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02350.x.

Torkar KG and Seme K. 2009. Antimicrobial susceptibility, beta-lactamase and enterotoxin production in *Bacillus cereus* isolates from clinical and food samples. Folia Microbiol 54, 233-238. https://doi.org/10.1007/s12223-009-0037-2.

Yu S, Yu P, Wang J, Li C, Liu C, Kong L, Yu L, Wu S, Lei T, Chen M, Zeng H, Pang R, Zhang Y, Wei X, Zhang J, Wu Q and Ding Y. 2020. A study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China. Front Microbiol 10, 3043. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03043.