

ARTICLE

토마토 농가 환경에서 분리한 *Bacillus cereus*의 열저항성 분석

류민경 · 임영실 · 이지연*

동의대학교 식품영양학과

Heat Resistance Analysis of *Bacillus cereus* Isolated from the Tomato Farm Environments

Minkyong Ryu, Yeongsil Lim, Jeeyeon Lee*

Department of Food & Nutrition, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

Received: November 11, 2022
Revised: December 10, 2022
Accepted: December 12, 2022

*Corresponding author :
Jeeyeon Lee
Department of Food & Nutrition,
Dong-eui University, Busan 47340,
Korea
Tel : +82-51-890-1596
E-mail : jylee@deu.ac.kr

Copyright © 2022 Resources Science Research Institute, Kongju National University. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Minkyong Ryu
<https://orcid.org/0000-0002-6389-5169>
Yeongsil Lim
<https://orcid.org/0000-0002-9160-1535>
Jeeyeon Lee
<https://orcid.org/0000-0002-5885-6835>

Abstract

Bacillus cereus (*B. cereus*) is a spore forming bacteria with a highly adhesive ability on the food surface and which expresses concern about commercial sterilization due to heat resistance. In this study, the heat challenge was performed at 60°C for 60 min to derive the importance of the inactivation of bacteria by time during heating 14 isolates of *B. cereus* from the tomato farm environment. As a result, the final cell counts of *B. cereus* reduced after heating were -3.6 Log CFU/mL on average (minimum: -2.8 Log CFU/mL, maximum: -4.7 Log CFU/mL). Reduced cell counts of *B. cereus* after heating for 60 min ranged from 0.5 Log CFU/mL to 2.4 Log CFU/mL. Remained *B. cereus* after heating can recover in an appropriate environment, and cause foodborne illness. *B. cereus* existed in the farm environment during the cultivation stage of agricultural products can be transferred to agricultural products through various routes such as soil, toilet handles and worker gloves, thus, the management of *B. cereus* in a farm environment is essential. In addition, improper sterilization, manufacturing, processing and packaging in the food processing stage cannot be expected to inhibit the complete growth of foodborne pathogenic bacteria, and the risk of foodborne illness can be increased. Therefore, thorough management of these processes is considered important.

Keywords

Heat resistance, *Bacillus cereus*, Tomato farm environment, Food safety

1. 서론

*Bacillus cereus*는 그람양성의 간균으로 포자를 형성하는 식중독 세균 중 하나이며(Guinebretiere *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2014), 증상은 설사형 또는 구토형의 위장 질환이 있다(Arnesen *et al.*, 2008; Voort and Abee, 2013). 설사 증상은 소장 상피세포의 원형질막에서 hemolysin BL(HBL) 및 비용혈성 장독소(nonhemolytic enterotoxin, Nhe), 세포독성 K(cytotoxin K, CytK)와 같은 단백질 장독소의 수평 유전자 전달로 인해 발생한다(Arnesen *et al.*, 2008; Schoeni and Wong, 2005; Voort and Abee, 2013). 구토 증상은 구토 독소 유전자인 *ces* 유전자를 가진 *B. cereus*가 생성한 cereulide에 의해 발생된다(Hoton *et al.*, 2005; Rajkovic *et al.*, 2008; Voort and Abee, 2013). Rajkovic 등(2008)의 연구에 따르면, 구토 독성인자인 cereulide는 열 안정성이 높아 열에 의해 독성의 활성 손실이 유발되지 않으며, 매우 높은 pH(pH 9.5)에서 121-150°C에 일정 시간 이상(60-80분) 노출될 때만 비활성화되는 것으로 확인되었다.

이러한 장독소 및 독소 유전자로 인한 *B. cereus* 식중독 사고를 저해하려면 그에 맞는 적절한 관리

가 필요하다. 식품업계에서는 식품 제조·가공 시 수행되는 열처리, 동결, 건조 등의 일련의 절차를 통해 세균의 증식을 억제하거나 사멸시킨다(Mukhtar et al., 2020). 그러나 대표적인 포자형성균 중 하나인 *B. cereus*는 내열성이 강하고 식품에 부착되는 능력이 높아 상업적 살균으로 식중독 발생의 위험을 감소시키기에 어려움이 있다(Faille et al., 2002; Luksiene et al., 2009; Stalheim and Granum, 2009; Vilain et al., 2006). Pereira 등(2019)은 *B. cereus*는 고온(140°C)에서 장시간의 로스팅을 했을 때에도 적절한 세균 수 감소가 이루어지지 않았다고 보고하였다.

식중독 세균은 토양 및 식물, 곤충 등 다양한 매개체를 통해 식품에 유입될 수 있다(Arnesen et al., 2008). 토양에 내포된 세균이 작물 표면으로 이행되고, 그로 인해 부착된 세균이 식중독 발생을 유발한다는 점을 생각해 볼 필요가 있다. 토양에는 여러 영양성분 및 유기물뿐만 아니라 식중독 세균이 존재할 수 있으며, 식중독 세균 중 건조한 환경에서도 포자 형성을 통해 생존이 가능한 *Bacillus* spp.가 빈번하게 검출된다(Yu et al., 2014). Yu 등(2014)은 토양에서 분리된 세균의 유전적 식별을 통해 총 136개의 균주를 확인하였으며, 그 중 79개는 *Bacillus* spp.에 속했고, *Bacillus subtilis*(n=32), *Bacillus pumilus*(n=14), *B. cereus*(n=4) 등이 분리되었다고 보고하였다.

토마토(*Lycopersicon esculentum*)는 세계에서 가장 많이 재배되는 원예작물 중 두 번째를 차지하는 작물로, 대부분 토양 재배가 주를 이룬다(FAOSTAT, 2001). 2001년 기준, 세계 생산량은 국가별로 최소 370만 톤에서 최대 1억 톤으로, 경제적으로 중요한 작물이며(FAOSTAT, 2001), 온도, 습도, pH, 염도 등의 조건에 따라 생산량이 기하급수적으로 증가하기 때문에 재배가 용이하지만 토양과 밀접하게 자라는 재배조건에 따라 *Bacillus* spp.의 부착에 의한 식중독 사고가 우려되는 작물이다(Mukhtar et al., 2020). Frenzel 등(2020)에 따르면 426개의 생토마토에서 *B. cereus*를 분석하였으며, 그 결과 28%의 시료에서 *B. cereus*가 검출된 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구의 목적은 토양이 감염원이 되어 발생하는 식중독 발생 우려에 따라 토마토 농가의 환경에서 분리된 *B. cereus*를 파악하고, 일정 온도에서의 지속적인 열처리에 따른 시간별 불활성화 정도를 측정하여 *B. cereus*의 열 저항성을 확인하는 것이다.

II. 재료 및 방법

Bacillus cereus 접종액 준비

광명 지역에 위치한 토마토 농가의 재배환경, 포장·저장, 수확, 육묘·재배 등 각 단계에서 16개의 환경 시료(토양, 양액, 화장실 손잡이, 작업대 등)를 채취하여 *B. cereus*를 분리하였다. 19개의 *B. cereus* 의심 집락 중 16s rRNA sequencing 분석을 통해 최종 확인된 *B. cereus* 14개에 한하여 실험을 진행하였다(Table 1). 희석도말의 형태로 냉장보관하였던 14개의 *B. cereus*의 단일 집락을 이용하여 접종액을 준비하였다. 각 균주는 Tryptic Soy broth(TSB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MN, USA)에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 활성화 시켰다. 활성화된 균주를 새로운 TSB에 동일한 조건으로 계대 배양한 후, 15 mL conical tube에 옮겨 1,912 × g, 4°C에서 15분 동안 원심분리하여 세척하였다. 상층액을 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS; pH 7.4; KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 1.5 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g/멸균증류수 1 L)을 세균액과 동량으로 가한 뒤 균체를 현탁시켰다. 이 과정을 2회 반복하였으며, PBS를 이용하여 현탁액을 6-7 Log CFU/mL 수준으로 적절히 희석하여 접종액으로 사용하였다.

*Bacillus cereus*의 열저항성 분석

*B. cereus*의 열저항성을 분석하기 위하여 클린벤치 내에서 앞서 준비한 접종액 중 1 mL를 사전에 항온수조에서 60°C로 데워진 9 mL의 TSB에 접종하였다. 접종 직후 시료를 혼합하여 1 mL를 취한

Table 1. Information of *Bacillus cereus* used in this study

Farm type	Isolated sample name	No. of <i>Bacillus cereus</i>
Facility	Handle of the toilet	1
	Handle of the toilet	2
	Handle of the toilet	3
	Gloves	4
	Packing container	5
Hydroponic cultivation	Handle of the toilet	6
	Scale	7
	Packing table	8
	Harvesting table	9
	Gloves	10
	Gloves	11
	Soil (stem)	12
	Nutrient solution for hydroponics cultivation	13
	Nutrient solution for hydroponics cultivation	14

뒤 9 mL의 0.1% buffered peptone water(BPW; Becton, Dickinson and Company)를 이용하여 적절히 십진희석하였다(0 min). 시료는 1 mL를 취한 후 즉시 60°C 항온수조에 넣어 최대 60 min까지 열을 가하였다. 십진희석한 희석액을 0.1 mL씩 취하여 Tryptic Soy Agar(Becton, Dickinson and Company)에 분주하고 평판도말을 실시하였다. 20분 간격으로 항온수조에 있는 시료를 꺼내어 동일한 방법으로 평판도말한 후, 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 집락을 계수하고 아래의 계산식에 따라 집락 수를 계산하였다. 열저항성 분석은 2회 반복실험하였다.

$$\text{Log CFU/mL} = \text{Log}(\text{CFU} \times 10^{\text{-Dilution factor}})$$

III. 결과 및 고찰

열저항성 분석 결과, 0 min에서 60 min에 이르기까지 *B. cereus* 세균 수는 감소하는 패턴을 보였으며, 0 min에서 평균 5.3±0.2 Log CFU/mL(최소 5.0 Log CFU/mL, 최대 5.9 Log CFU/mL)이던 초기 세균수가 60 min에 평균 1.7±0.2 Log CFU/mL(최소 0.5 Log CFU/mL, 최대 2.4 Log CFU/mL)까지 감소하는 것으로 나타났다(Table 2). 0-20 min 구간은 급격한 감소가 발생하였으며, 평균 -2.9 Log CFU/mL(최소 -2.4 Log CFU/mL, 최대 -3.6 Log CFU/mL)의 감소를 확인할 수 있다. 초기 세균수(0 min)와 최종 세균수(60 min)의 결과만을 비교하면 평균 -3.6 Log CFU/mL 수준으로 감소했으며, 최소 감소 수준은 -2.8 Log CFU/mL(2번 *B. cereus*), 최대 감소 수준은 -4.7 Log CFU/mL(6번 *B. cereus*)로 나타났다(Table 3). 열저항성 결과, 균주 별로 열저항성에 차이가 있는 것으로 확인되었으며, 2번 균주는 6번 균주에 비하여 열저항성이 비교적 높은 것이라고 말할 수 있다.

*B. cereus*는 토양, 식물 등 자연계에 널리 존재할 수 있으며 토양에 접촉한 유기물 및 동물(숙주) 혹은 자발적인 포자 형성을 통해 식품으로 이행될 수 있다(Arnesen *et al.*, 2008; Vilain *et al.*, 2006). 또한 식품 가공 시 부적절한 세척 및 보관으로 식품에 부착된 세균이 교차오염될 가능성도 있다. 그로

Table 2. The cell counts of *Bacillus cereus* isolates during heating at 60°C for 60 min

No. of <i>Bacillus cereus</i>	Cell counts (Log CFU/mL)			
	0 min	20 min	40 min	60 min
1	5.0±0.4	2.3±0.4	2.1±0.4	1.9±0.5
2	5.0±0.4	2.4±0.2	2.3±0.2	2.2±0.2
3	5.2±0.2	2.6±0.3	2.4±0.4	2.4±0.4
4	5.5±0.3	2.9±0.7	2.4±1.0	2.2±1.0
5	5.1±0.7	2.0±0.2	1.7±0.2	1.7±0.3
6	5.2±0.0	1.6±0.1	0.8±0.7	0.5±0.5
7	5.7±0.1	2.6±0.1	1.6±0.2	1.5±0.3
8	5.8±0.0	2.7±0.3	1.5±0.5	1.6±0.2
9	5.3±0.2	2.9±0.2	2.0±0.4	2.0±0.5
10	5.9±0.1	2.7±0.1	2.3±0.5	2.2±0.4
11	5.0±0.1	2.4±0.1	1.9±0.2	1.8±0.4
12	5.3±0.0	2.5±0.2	1.9±0.1	2.0±0.1
13	5.3±0.3	2.2±0.1	1.7±0.3	1.7±0.2
14	5.2±0.0	2.4±0.1	1.3±0.4	0.8±0.3

mean±SD.

Table 3. Reduction level in final cell counts at 60 min compared to initial cell counts at 0 min of *Bacillus cereus* during heating at 60°C

No. of <i>Bacillus cereus</i>	Cell counts (Log CFU/mL)		
	Initial (0 min)	Final (60 min)	Reduction level
1	5.0±0.4	1.9±0.5	-3.1
2	5.0±0.4	2.2±0.2	-2.8
3	5.2±0.2	2.4±0.4	-2.8
4	5.5±0.3	2.2±1.0	-3.3
5	5.1±0.7	1.7±0.3	-3.4
6	5.2±0.0	0.5±0.5	-4.7
7	5.7±0.1	1.5±0.3	-4.2
8	5.8±0.0	1.6±0.2	-4.2
9	5.3±0.2	2.0±0.5	-3.3
10	5.9±0.1	2.2±0.4	-3.7
11	5.0±0.1	2.0±0.2	-3.0
12	5.3±0.0	2.0±0.1	-3.3
13	5.3±0.3	1.7±0.2	-3.6
14	5.2±0.0	0.8±0.3	-4.4

mean±SD.

인해 가공식품 및 식품 생산 기기에 식중독 세균이 검출될 수 있으며(Vilain et al., 2006), 포자형성균의 경우 외부 스트레스에 저항하는 능력이 강한 포자로 인해 전 식품 생산 라인의 정기적인 청소로도 사멸시키기 어려워 식중독 사고 발생의 위험이 높다(Faille et al., 2001; Vilain et al., 2006).

본 연구에서는 열로 인한 *B. cereus* 생균수의 감소를 확인하였으나, 생균수가 더 이상 감소하지 않고 유지되는 구간을 확인할 수 있었다. 이러한 것을 tail effect라고 하며, tail effect는 불활성화 후의

잔여 생균수가 무한대로 향하는 것으로(Koutsoumanis *et al.*, 1999), 잔여 생균수가 적을지라도 세균의 recovery 기전으로 인하여 식품을 부적절한 환경(예: 상온)에 방치할 때 세균 증식으로 인한 식중독 사고 발생의 위험을 야기시킬 수 있다. 불활성화 처리 이후 생존한 세균은 그 특성에 맞는 영양성분이 공급될 시 정상적으로 자랄 수 있다고 알려져 있다(Dabbah *et al.*, 1969). 또한 Kragh 등(2022)은 열을 통해 건조된 버섯에서의 *B. cereus* 성장을 확인하였으며, 열처리를 통해 불활성화되었던 *B. cereus*가 가정 내에서 재수화되는 과정에서 성장하는 것을 보여주었다. *B. cereus*의 doubling time은 20-60분이며, 최소감염량(infectious dose)은 대략 10^5 CFU/g(또는 mL)로 알려져 있다(Frentzel *et al.*, 2020). Doubling time을 20분이라고 가정하였을 때, 열 저항성이 가장 큰 것으로 확인된 2번 *B. cereus*는 60°C에서 열처리를 60분 동안 하더라도 잔여 생균수가 200여분 만에 식중독을 유발시킬 수 있는 수준까지 성장할 수 있다.

그러므로 *B. cereus*의 식품 유입 방제를 위해서는 해당 세균에 대한 주의가 필요하다. 현재 식품 위생에 대한 소비자의 인식은 높아지고 있으며, 위생 관리에 대한 지식을 습득하여 자발적인 위생관리에 초점을 두고 식품을 통한 식중독 사고 감소를 중요하게 보고 있다. 따라서 식품 업체의 꾸준한 모니터링과 자발적인 위생관리를 통해 식품 매개 식중독 사고의 절감과 식품 안전성을 확보할 수 있는 각고의 노력이 필요하다.

IV. 요약

*B. cereus*는 식품 표면의 접착능이 높고 대표적인 포자형성균으로 특히 포자는 내열성이 있어 식품업체의 상업적 멸균을 통해서도 제어하기 어렵다. 본 연구에서는 토마토 농가 환경에서 분리된 14개의 *B. cereus*를 60°C에서 60분 동안 열처리하면서 시간별 *B. cereus*의 불활성화 정도를 도출하여 *B. cereus*의 열저항성을 확인하였다. 그 결과, 60분 동안 열처리 후 감소된 *B. cereus* 세균수는 평균 -3.6 Log CFU/mL(최소 -2.8 Log CFU/mL, 최대 -4.7 Log CFU/mL)로 나타났다. 열처리 후 잔존하는 *B. cereus* 생균수는 최소 0.5 Log CFU/mL, 최대 2.4 Log CFU/mL로 확인되었다. 열처리 후 잔존하는 *B. cereus*는 생육하기에 적합한 환경이 되면 recovery되어 성장 가능하며, 이는 *B. cereus* 식중독 발생의 원인이 될 수 있다. 농산물의 재배단계에서 농가 환경에 존재하는 *B. cereus*는 다양한 경로(토양, 화장실 손잡이, 작업자 장갑 등)를 통해 농산물로 이행될 수 있기 때문에 농가 환경에서의 *B. cereus*의 관리는 필수적이다. 또한, 식품 가공단계에서의 부적절한 살균·제조·가공·포장 등은 식중독 세균의 온전한 생육 억제를 기대할 수 없고, 식중독 발생 위험을 높일 수 있으므로 이러한 공정에 대한 식품 업체의 철저한 관리가 중요하다고 판단된다.

V. 참고문헌

- Arnesen LPS, Fagerlund A, Granum PE. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 32:579-606.
- Dabbah R, Moats WA, Mattick JF. 1969. Factors affecting resistance to heat and recovery of heat-injured bacteria. J Dairy Sci 52:608-614.
- Faille C, Fontaine F, Bénézech T. 2001. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. J Appl Microbiol 90:892-900.
- Faille C, Jullien C, Fontaine F, Bellon-Fontaine MN, Slomianny C, Bénézech T. 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: Role of surface hydrophobicity. Can J Microbiol 48:728-738.
- Frentzel H, Juraschek K, Pauly N, Kelner-Burgos Y, Wichmann-Schauer H. 2020.

- Indications of biopesticidal *Bacillus thuringiensis* strains in bell pepper and tomato. *Int J Food Microbiol* 321:108542.
6. Food and Agriculture Organization of the United Nations(FAOSTAT). 2001. Crop information: Tomato. Available from: <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/tomato/en/>. Accessed at Nov 06. 2022.
 7. Guinebreti re MH, Velge P, Couvert O, Carlin F, Debuyser ML, Nguyen-The C. 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (Groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol* 48:3388-3391.
 8. Hoton FM, Andrup L, Swiecicka I, Mahillon J. 2005. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* 151:2121-2124.
 9. Koutsoumanis K, Lambropoulou K, Nychas GE. 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *Int J Food Microbiol* 49:63-74.
 10. Kragh ML, Obari L, Caindec AM, Jensen HA, Hansen LT. 2022. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium* on sliced mushrooms during drying in a household food dehydrator. *Food Control* 134:108715.
 11. Luksiene Z, Buchovec I, Paskeviciute E. 2009. Inactivation of food pathogen *Bacillus cereus* by photosensitization *in vitro* and on the surface of packaging material. *J Appl Microbiol* 107:2037-2046.
 12. Mukhtar T, Rehman SU, Smith D, Sultan T, Seleiman MF, Alsadon AA, Amna, Ali S, Chaudhary HJ, Solieman THI, Ibrahim AA, saad MAO. 2020. Mitigation of heat stress in *Solanum lycopersicum* L. by ACC-deaminase and exopolysaccharide producing *Bacillus cereus*. *Sustainability* 12:2159.
 13. Pereira APM, Stelari HA, Carlin F, Sant'Ana AS. 2019. Inactivation kinetics of *Bacillus cereus* and *Geobacillus stearothermophilus* spores through roasting of cocoa beans and nibs. *LWT* 111:394-400.
 14. Rosenquist H, Smidt L, Andersen SR, Jensen GB, Wilcks A. 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol Lett* 250:129-136.
 15. Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, In 't Veld P, Denon Q, V rhe R, Debevere J. 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett Appl Microbiol* 46:536-541.
 16. Stalheim T, Granum PE. 2001. Characterization of spore appendages from *Bacillus cereus* strains. *J Appl Microbiol* 91:839-845.
 17. Schoeni JL, Wong ACL. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* 68:636-648.
 18. Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 32:579-606.
 19. Vilain S, Luo Y, Hildreth MB, Br zel VS. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl Environ Microbiol* 72:4970-4977.
 20. Voort MVD, Abee T. 2013. Sporulation environment of emetic toxin-producing

Bacillus cereus strains determines spore size, heat resistance and germination capacity.
J Appl Microbiol 114:1201-1210.

21. Yu X, Li Y, Zhang C, Liu H, Liu J, Zheng W, Kang X, Leng X, Zhao K, Gu Y, Zhang X, Xiang Q, Chen Q. 2014. Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. PLoS One 9:e106618.