

Bacillus cereus, *Streptococcus agalactiae*와 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 정제봉독의 항균효과

한상미* · 우순옥 · 김세건 · 장혜리 · 이경우¹

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부, ¹건국대학교 동물자원과학과

Antibacterial Effects of Purified Bee Venom against *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Pseudomonas aeruginosa*

Sang Mi Han*, Soon Ok Woo, Se Gun Kim, Hye Ri Jang and Kyung Woo Lee¹

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration,
Wanju 55365, Korea

¹Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

(Received 15 January 2018; Revised 14 April 2018; Accepted 24 April 2018)

Abstract

Bacillus cereus, *Streptococcus agalactiae* and *Pseudomonas aeruginosa* can cause disease in plants and animals, including humans. A species of considerable medical importance, they are a multidrug resistant pathogen recognised for their ubiquity, its intrinsically advanced antibiotic resistance mechanisms, and its association with serious illnesses - hospital-acquired infections such as ventilator-associated pneumonia and various sepsis syndromes. *B. cereus*, *S. agalactiae* and *P. aeruginosa* were tested for antibacterial effects to purified bee venom (*Apis mellifera* L.). We evaluated the antibacterial effect of purified bee venom by minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), time-kill assay and postantibiotic effect (PAE). Purified bee venom exhibited significant inhibition of bacterial growth of *B. cereus*, *S. agalactiae* and *P. aeruginosa* with MIC value of 1.835 ± 0.202 , 0.54 ± 0.32 and $0.056 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$, respectively. The MBC value of purified bee venom against *B. cereus*, *S. agalactiae* and *P. aeruginosa* were 33.9 ± 1.23 , 4.08 ± 0.3 and $0.59 \pm 0.279 \mu\text{g/ml}$. In the presence of $2 \times \text{MIC}$ concentrations of the purified bee venom, indicating that growth of all bacteria was also significantly inhibited within 4 hours. Furthermore, the results of PAE values against *B. cereus*, *S. agalactiae* and *P. aeruginosa* showed the bacterial effect with 1.5, 1.5 and 5.5 hr. In this study, these results were suggested that purified bee venom might be utilized as a natural antibiotic agents in animal diets.

Key words: *Apis mellifera*, Purified bee venom, *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, MIC, MBC

*Corresponding author. E-mail: sangmih@korea.kr

서 론

생활수준의 향상과 건강에 대한 관심 증대로 안전한 먹거리에 대한 요구도가 높아지고 있는 추세이다. 농축산물의 안전성을 위협하는 식중독 사고의 원인이 되는 병원성 미생물 오염은 생산단계에서 유통과정에 이르는 전 단계에서 일어날 수 있으며, 특히 이러한 오염원과 오염 과정 중에 발생하는 독소 등에 의해 식중독, 패혈증 등이 유발될 수 있다(FDA, 2005). 농축산물에서 빈번하게 검출되는 토양 유래 세균인 *Bacillus cereus*는 구토나 설사를 일으키는 독소형 식중독 세균으로 알려져 있으며 주로 육류나 소시지가 원인 식품이다(Kramer *et al.*, 1989; Phelps and McKillip, 2002).

*B. cereus*에 의한 설사형 식중독은 *B. cereus*가 소장에서 증식하는 동안 생성되는 장독소(enterotoxin)로 인해 유발된다(Kim *et al.*, 2006). 또한 구토형 식중독은 emetic toxin에 의해 유발되는 식중독으로 가열하여도 파괴되지 않는 열 저항성과 산, 알칼리, 단백질 가수분해효소에도 저항성을 가지고 있다(Hansen *et al.*, 2001). *Streptococcus agalactiae*는 젖소 질병 중 가장 많이 발생하는 유방염의 원인균이며, 신생아 폐렴, 패혈증과 같은 신생아 감염의 주요 원인균으로 알려져 있다(Farley, 2001). 특히 젖소 유방염은 우유 중에 체세포수가 증가하여 유질이 저하되고 유량이 감소, 치료비 지출 등 경제적 손실이 매우 큰 질병 중 하나이다(Lee *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa*은 패혈증, 전신감염, 만성기도 감염증 및 췌장포성 섬유증 환자에게 난치성 감염을 일으키는 병원균이다(Cryz Jr, 1984). 수술이나 화상, 외상 등 저항력이 저하된 환자가 *P. aeruginosa*에 감염되어 패혈증에 걸리면 고열과 혈압저하 등 쇼크를 일으켜 결국 사망에까지 이르게 된다(Cryz Jr, 1984; Chamberland *et al.*, 1992). 최근 우리나라에서 입원 치료 중인 개와 고양이로부터 항생제 내성 유전자를 보유하고 있는 *P. aeruginosa*를 검출하였다고 보고된 바 있다(Cho *et al.*, 2013).

본 연구에서는 순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 및 면역증강 등의 효과를 갖는 봉독을 이용하여 사람과 가축 모두에 질병을 유발하는 병원균에 항

균효과를 갖고 있는지를 알아보려고 하였다. 서양종 꿀벌(*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(melittin)은 항염증과 항균작용, 강력한 진통작용, 면역증강 등의 역할을 한다고 알려져 있다(Habermann and Reiz, 1965; Fennelle *et al.*, 1967; Piek, 1986). 본 연구팀에서는 2005년 봉독채집장치와 채집된 봉독으로부터 이물질 제거할 수 있는 봉독정제법을 개발하였고(한 등, 2007). 정제봉독이 폐사한 육계로부터 분리한 *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* 그리고 *Salmonella montevideo*에 대해 높은 항균력을 갖고 있음을 확인하였다(Han *et al.*, 2016). 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 등 유방염 원인균에 의해 유발된 젖소 유방염의 경우 봉독 투여로 체세포수가 크게 감소하였으며, 유방염에 감염된 젖소로부터 채취한 원유에서 분리한 균에 대한 항균력이 우수한 것으로 보고된 바 있다(Han *et al.*, 2007). 또한 봉독을 자돈 및 양계에 처리했을 때 체중 및 생존율 증가와 같은 생산성 향상과 질병 감소에 효과를 나타내었다(Han *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010a). 뿐만 아니라 봉독을 분만 전 교소혈(交巢穴)에 투여한 경우 분만 소요시간 단축과 후산 정체를 감소 등 분만효율이 개선되었으며, 발정 재귀일수와 분만간격의 단축과 봉독을 투여한 어미소로부터 출생한 신생송아지의 체중 증가와 질병이 감소하는 것으로 보고되었다(Han *et al.*, 2010b).

따라서 본 연구에서는 사람과 가축에게 질병을 유발하며 기존의 항생제에 내성이 높은 세균에 대한 봉독의 항균력을 측정하여 사료 내 항생제 대체제로서의 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

봉독 시료

봉독은 서양종 꿀벌에 봉독 채집장치(청진테크, 한국)를 이용하여 채취 분리한 다음 간이정제방법으로(한 등, 2007) 정제한 정제봉독(한국정제봉독협동조합, 한국)을 구입하여 UPLC(Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters, USA)를 이용하여 주요성분

함량을 분석 후 실험에 사용하였다(Table 1, Han *et al.*, 2016). 시험에 사용한 정제봉독의 멜리틴, 포스포리파아제 그리고 아파민의 함량은 각각 63.6%, 10.9%, 2.3%였다.

공시균주 및 배양 조건

시험에 사용한 균주는 건국대학교로부터 *B. cereus* (ATCC 11778), *S. agalactiae* (ATCC 13813) 그리고 *P. aeruginosa* (ATCC 15442)를 분양받아 사용하였다. *B. cereus*는 NB (Nutrient broth, BD Difco, USA) 배지에, *S. agalactiae*는 5% sheep blood (MD cell, USA)를 포함한 TSA (Trypticase soy agar, BD Difco, USA)배지에 그리고 *P. aeruginosa*는 TSA 배지를 사용하여 37°C에서 배양하여 실험 전까지 2회 계대배양 후 실험에 사용하였다.

최소생장억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)와 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 측정

액체배지 희석법을 사용하여 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa* 세균에 대한 최저생장억제농도를 구하였다(CLSI, 2012). 정제봉독은 멸균 증류수로 희석한 후 무균 여과하여 액체배지희석법에 준하여 단계적으로 희석하였다(Wu와 Hancock, 1999). 각각의 시험균주를 액체배지에서 전 배양한 후 접종 균의 2×10^6 CFU/well이 되도록 조절하여 봉독 시료와 함께 18시간 동안 배양한 후, 육안 및 현미경으로 균의 성장을 관찰하였고, 흡수파장 625nm에서 흡광도(Molecular device spectramax M2e, CA)를 측정하여 순수배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제농도로 결정하였다(NCCLS, 2008). 정제봉독의 최소살균농도값은 각각의 시험균주에서 사용하는 액체배지로 희석한 후 액체배지희석법에 따라 단계적으로 희석 한 후 2×10^6 CFU/well이 되도록 조절한 각각의 균주에 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 각각의 배양액 100 μ L를 새로운 배지에 접종하여 24시간 동안 배양한 다음 흡광도(625nm)를 측정하여 증식이 일어나지 않은 농도를 최소살균농도로 나타내었다(NCCLS, 2008).

생육저해 효과(Time-kill assay)

시험균주에 대한 정제봉독의 살균력 지속시간을 측정하기 위하여 1×10^8 CFU/mL 조절한 균주에 각각 MIC, $2 \times$ MIC, 그리고 $10 \times$ MIC값 농도의 정제봉독과 함께 37°C로 배양하였다. 배양 후 4시간 간격으로 0.5mL을 취하여 4.5mL의 새로운 액체배지와 함께 37°C에서 배양하였다. 각각 24시간 배양 후 평판배지에 접종하여 균수를 측정하였다(Schwalbe *et al.*, 2007).

항균력 지속 시간(Postantibiotic effect, PAE) 측정

시험균주에 대한 정제봉독의 살균력 지속시간을 측정하기 위하여 1×10^8 CFU/mL로 조절한 균주에 $2 \times$ MIC값 농도의 정제봉독과 함께 1시간동안 배양한 후 원심분리와 배지 희석법을 사용하여 봉독성분을 제거하였다(Löwdin *et al.*, 1993). 이후 새로운 배지로 교환하여 배양기에서 배양하면서 2시간 간격으로 균수를 측정하였다. 이때 PAE 수치가 클수록 항균 지속 효과가 우수하다고 할 수 있으며, PAE를 구하는 식은 아래와 같다.

$$PAE = T - C$$

T: 봉독을 처리한 시험구에서 1 log₁₀까지의 생육에 걸리는 시간

C: 무처리구에서 1 log₁₀까지의 생육에 걸리는 시간

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 R 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SEM)로 표시하였다.

결 과

정제봉독의 최소생장억제 농도와 최소살균농도

B. cereus, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa*에 대한 정제봉독의 최소생장억제농도는 각각 1.835 ± 0.202 , 0.54 ± 0.32 그리고 $0.056 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 로 매우 높은 항

Table 1. Conditions for Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) analysis of purified bee venom

Items	Conditions		
Column	Halo ES-18 (4.6×100mm, 2.7µm)		
Flow rate	1.5mL/min		
Injection volume	4µL		
Column temperature	50°C		
Sample temperature	5°C		
Mobil phase	Time (min)	A ¹⁾ (%)	B ²⁾ (%)
	0	10	90
	3	31	69
	5	40	60
	10	45	55

¹⁾A is 20mM TFA/MeCN

²⁾B is 20mM TFA/H₂O

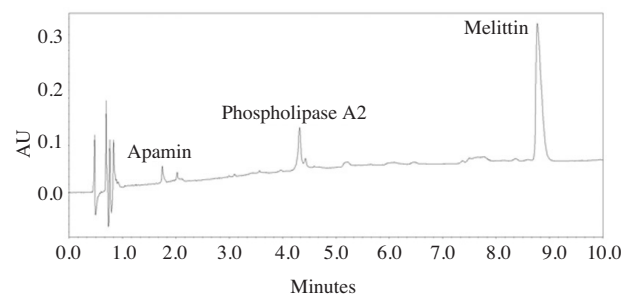
Table 2. MIC and MBC values of purified bee venom against *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae* and *Pseudomonas aeruginosa*

Bacteria	Purified bee venom (Mean ± SED, µg/mL) ¹⁾	
	MIC	MBC
<i>Bacillus cereus</i>	1.84 ± 0.20 ¹⁾	33.9 ± 1.23
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.54 ± 0.32	4.08 ± 0.30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.07 ± 0.01	0.59 ± 0.27

¹⁾All values are Mean ± SED of triplicate.

Table 3. PAE of purified bee venom against *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae* and *Pseudomonas aeruginosa*

Strains	PAE (hr.)
<i>Bacillus cereus</i>	1.5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.5

**Fig. 1.** Ultra performance liquid chromatography spectrum of the purified bee venom.

균력이 확인되었다(Table 2). 최소살균농도 역시 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa* 균에 대해 각각 33.9 ± 1.23, 4.08 ± 0.3과 0.59 ± 0.27 µg/ml로 높은 살균력을 갖고 있었다(Table 2). 특히 녹농균인 *P. aeruginosa*

는 정제봉독에 대해서 매우 높은 감수성을 보였다.

정제봉독의 생육저해 효과

B. cereus, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa* 세균에 대한 1×MIC, 2×MIC 그리고 10×MIC의 정제봉독을 24시간동안 배양하면서 4시간 간격으로 24시간동안 각 세균의 생장에 미치는 영향을 시험한 결과, 모든 농도에서 균의 생장이 저해되는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 모든 균주에 대해 2×MIC 농도의 정제봉독을 처리한 경우에 4시간 배양만으로도 충분히 균의 생장이 유의적으로 저해되는 효과를 확인 할 수 있었다(p<0.001). *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa* 세균은 10

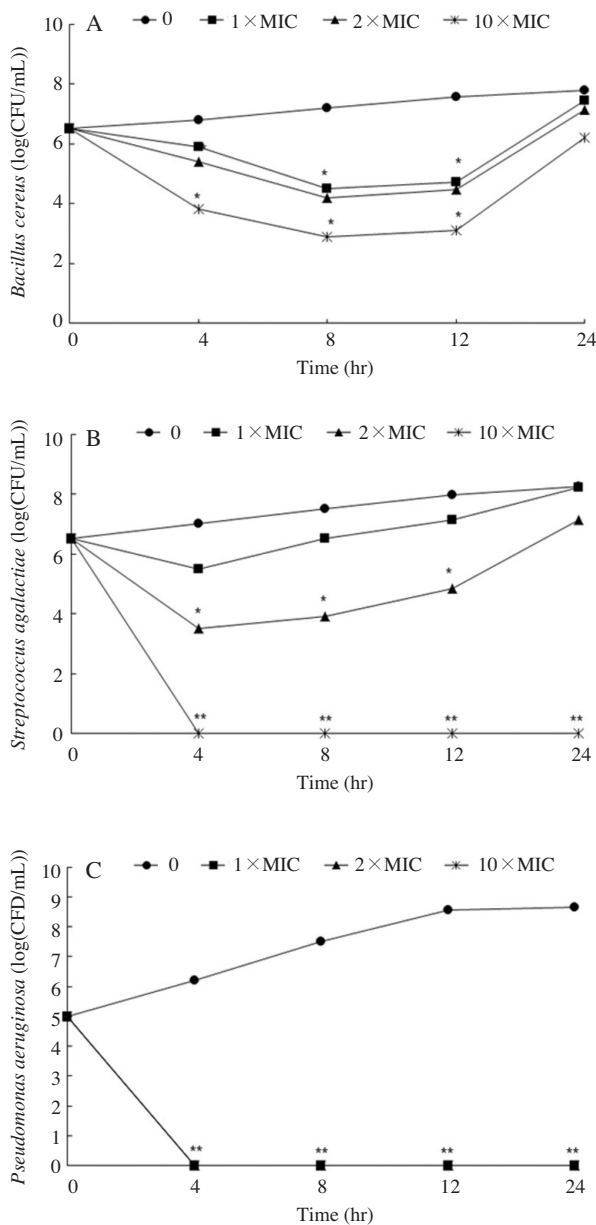


Fig. 2. Time-kill assay of the purified bee venom against (A) *Bacillus cereus*, (B) *Streptococcus agalactiae* and (C) *Pseudomonas aeruginosa*. Data are represented as mean \pm SED of three experiments. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$.

\times MIC 농도의 정제봉독을 처리한 경우에 4시간 배양만으로도 충분히 균의 생장이 완전히 저해되어 사멸하는 효과를 확인 할 수 있었다($p < 0.0001$). 봉독을 처리하지 않은 대조구에서는 4시간 이후 균의 생장이 급격히 증가하는 것으로 확인되었다. 특히 *P. aeruginosa*균에 대해서는 $0.056 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 의 MIC 농

도에서도 4시간이 경과했을 경우에도 균의 생장이 저해되어 사멸하는 것을 확인할 수 있었다.

정제봉독의 항균력 지속시간

B. cereus, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa* 세균에 대한 정제봉독의 항균력 지속시간(PAE)을 측정하였다. 봉독 제거 후 2시간 간격으로 균수를 측정한 결과 Table 3과 같이 *B. cereus*에서는 1.5시간, *S. agalactiae*은 1.5 시간인 반면 *P. aeruginosa* 세균에서는 5.5시간으로 매우 우수한 항균력 지속시간을 갖고 있었다.

고 찰

가축과 반려동물은 오래전부터 사람과 밀접한 관계를 가져왔고, 축산물로부터 식중독을 유발한다던지 병원균에 감염된 개와 고양이들로부터 병원균이 사람에게 전파될 수 있어 공중보건학적으로 중요하다. 가축의 사육과정에서 사용되는 항생제로 인하여 축산물에서 분리된 균주들에서 항생제 내성균이 검출되어 감염증의 치료를 어렵게 할 뿐만 아니라 인수 공통 세균이 항생제 내성을 갖게 되어 사람에게 감염될 경우 심각한 문제를 초래할 수 있다. *B. cereus*는 그람양성세균이며 간균의 형태이고 편모를 가지고 있고, 내생포자는 중앙에 편재되어있는 통성혐기성균으로 penicillin에 내성이 있으며, 가장 흔한 감염은 식중독이나 전신성 감염을 비롯하여 드물게 창상, 화상, 혈액투석, 수혈, 척수 마취할 때 및 면역이 약한 사람에게 감염을 일으킬 수도 있다(Lund, 1990; Drobniewski, 1993). *B. cereus*는 많은 단백분해효소를 생성하여, 사람과 기축에게 독성을 보이기 때문에 내성을 갖지 않는 항생제 치료가 중요하다. *S. agalactiae*는 catalase 음성 연쇄구균으로서 원래는 젖소 유방염의 원인균이었으며 사람의 감염은 1938년 산욕기 패혈증 환자에서 최초로 보고되었다(Farley, 2001). 이후 오랫동안 *S. agalactiae*에 의한 인체 감염은 산발적인 증례 보고가 있었으나 임상적 의의는 불확실한 것으로 생각하였다. 그러나 1960년대 말부터 임신부와 신

생아 감염 환자에서 이전보다 높은 분리율을 보였고 1970년대에는 신생아 패혈증과 뇌막염 환자에서의 분리율이 급격히 증가하였으며 동시에 임신부와 성인에서의 감염이 증가하기 시작하여 1990년대 이후로 임상 검체에서의 분리율이 증가하고 있으며 항균제 내성률 또한 높아지고 있는 것으로 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 2013).

*P. aeruginosa*는 그람음성의 호기성 간균으로 병원에 입원한 환자들에게 균혈증을 유발하는 위협한 균이지만 그동안은 *Taphylococcus aureus*을 우선 원인균으로 지목하여 그 위협성이 간과되고 있었다(Cryz, 1984). 그러나 미국 대도시 병원의 균혈증 환자 중에서 녹농균 균혈증에 의한 사망률이 높다는 연구 결과 뿐만 아니라 대부분 항생제에만 의존해 항생제 남용으로 내성 균주가 생겨 기존 상용 항생제에 의한 치료는 점점 어려워지고 있어 치료가 쉽지 않다는 점에서 우려되고 있는 상황이다(Hall과 Collis, 1998). 최근에는 녹농균이 요도 감염 및 콘택트렌즈 사용자의 각막 궤양에서도 검출되고 있으며 녹농균에 의한 각막 궤양이 발생하는 경우는 드물지만 일단 감염되면 실명에 이를 정도로 위험하다(Seo *et al.*, 2016). *P. aeruginosa*는 β -lactam 제제의 일부를 포함한 여러 항균제에 자연 내성이지만 ceftazidime와 piperacillin 그리고 ticarcillin 등에는 비교적 강한 항균력을 지닌다고 알려져 있었으나, 개에서 분리된 *P. aeruginosa*는 ampicillin, ceftazidime 그리고 sulfamethoxazole/trimethoprim에 대하여 높은 내성을 갖고 있으며, Rubin 등(2008)은 사용된 대부분의 항생제에 높은 내성을 보고하였다(Chamberland *et al.*, 1992; Yoo *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2013).

붕독은 살아있는 벌을 이용한 봉침요법으로 오래 전부터 인체 및 가축의 질병 치료에 사용되어 왔다. 최근 붕독체집장치의 개발과 붕독정제법이 개발됨에 따라 정제붕독은 화장품의 원료로 사용되고 있으며, 의약품과 동물용의약품, 사료첨가제 등으로 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 정제붕독을 사람과 가축 모두에 질병을 유발할 수 있는 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa*

에 대한 항균력을 측정하였다. 그 결과 최소생육억제농도는 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa*에서 각각 1.835 ± 0.202 , 0.54 ± 0.32 그리고 $0.056 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 이었으며 최소살균농도 역시 각각 33.9 ± 1.23 , 4.08 ± 0.3 과 $0.59 \pm 0.279 \mu\text{g/mL}$ 로 매우 높은 항균력을 갖고 있었다. 특히 *P. aeruginosa*에 대해서는 매우 높은 감수성을 갖고 있는 것으로 확인되었다. *B. cereus*, *S. agalactiae*와 *P. aeruginosa* 세균은 모두 정제붕독과 4시간 배양만으로도 충분히 균의 생장이 유의적으로 저해되는 효과를 확인 할 수 있었다 ($p < 0.001$). 정제붕독을 제거하고도 이 *B. cereus*에서는 1.5시간, *S. agalactiae*은 1.5시간인 반면 *P. aeruginosa* 세균에서는 5.5시간으로 매우 우수한 항균력 지속시간을 갖고 있었다.

이상의 연구 결과로 정제붕독은 기존의 항생제에 대한 내성이 우려되는 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa*에 대한 높은 항균력과 살균력을 갖고 있음을 확인하였으며, 가축의 면역력 향상과 질병을 유발하는 병원성 세균에 대한 항균효과가 뛰어난 정제붕독을 이용하여 천연항생 기능을 갖는 사료 원료로의 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

적 요

사람과 가축에 모두 질병을 유발할 수 있는 감염세균인 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa*에 대한 정제붕독의 항균효과를 검정한 결과, 최소성장억제농도는 각각 1.835 ± 0.202 , 0.54 ± 0.32 그리고 $0.056 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 로 매우 높은 항균력이 확인되었다. 최소살균농도 역시 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa* 균에 대해 각각 33.9 ± 1.23 , 4.08 ± 0.3 과 $0.59 \pm 0.279 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 살균력을 갖고 있었다. *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa* 세균은 $10 \times \text{MIC}$ 농도의 정제붕독을 처리한 경우에 4시간 배양만으로도 충분히 균의 생장이 유의적으로 저해되었으며, *P. aeruginosa* 균은 $1 \times \text{MIC}$ 농도에서도 균의 생장이 저해되었다. 정제붕독의 항균력 지속시간은 *B. cereus*는

1.5시간, *S. agalactiae*은 1.5시간, 그리고 *P. aeruginosa* 세균에서는 5.5시간이었다. 따라서 정제봉독은 기존의 항생제에 대한 내성 출현이 빈번한 *B. cereus*, *S. agalactiae* 그리고 *P. aeruginosa*에 대해 높은 항균력과 항균력 지속시간을 갖고 있는 것으로 확인되어 천연 항생제로서 사료 첨가제로 이용 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 (과제번호: PJ01316602)에 의하여 수행되었습니다.

인용 문헌

- 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용. 2007. 봉독의 간이 정제 방법, 대한민국특허 10-075881.
- Chamberland, S., J. L'Ecuyer, C. Lessard, M. Bernier, P. Provencher, M. G. Bergeron and Canadian Study Group. 1992. Antibiotic Susceptibility Profiles of 941 Gram-Negative Bacteria Isolated from Septicemic Patients Throughout Canada. Clin. Infect. Dis. 15: 615-628.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement, M100-S22. Wayne, Pa, USA.
- Cho, H. S., J. H. Lee, S. Y. Ryu, S. W. Joo, M. H. Cho and J. Lee. 2013. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by plant metabolite ϵ -viniferin. J. Agric. Food Chem. 61: 7120-7126.
- Cryz, Jr SJ. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* Infections. pp. 317-344. In: Germanier R(ed.). Bacterial Vaccines. Academic Press, Orlando.
- Drobniewski, F.A. 1993. *Bacillus cereus* and Related Species. Clin. Microbiol. Rev. 6(4): 324-338.
- Farley, M. M. 2001. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin Infect Dis 33: 556-561.
- FDA. 2005. Guidance for industry, Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables. Available From: <http://csan.fda.gov>.
- Fennell, J. F., W. H. Shipman and L. J. Cole. 1967. Antibacterial action of a bee venom fraction(melittin) against a penicillin-resistant *Staphylococcus* and other microorganisms. Res. Dev. Tech. Rep. 5:1-13.
- Habermann, E. and K. G. Reiz. 1965. On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. Biochemistry 343:192-203.
- Hall, R. M. and C. M. Collis. 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. Drug Resist. Updat. 1: 109-119.
- Han, S. M., S. G. Kim, I. P. Hong, S. O. Woo, H. R. Jang and K. W. Lee . 2016. Antibacterial effects of purified bee venom against some pathogenic bacteria isolated from dead chickens. Korean J. Vet. Serv. 39(3): 159-166.
- Han, S. M., K. G. Lee, J. H. Yeo, S. J. Hwang, P. J. Chenoweth and S. C. Pak. 2009. Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. Am. J. Chin. Med. 37(2): 833-842.
- Han, S. M., K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon, B. S. Kim, J. Y. Kim, H. J. Baek and S. T. Kim. 2007. Antibacterial activity of the honey bee venom against bacterial mastitis pathogens infecting diary cows. Int. J. Indust. Entomol. 14(2): 137-142.
- Han, S. M., K. G. Lee, J. H. Yeo, B. Y. Oh, B. S. Kim, W. Lee, H. J. Baek, S. T. Kim, S. J. Hwang and S. C. Pak. 2010a. Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. Poult. Sci. 89: 2396-2400.
- Han, S. M., K. G. Lee, J. H. Yeo, B. Y. Oh and S. T. Kim. 2010b. Effects of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on the reproductive efficiency of dams and the growth performance, disease occurrence of Hanwoo calves. Korean J. Vet. Serv. 33(3): 287-292.
- Hansen, B. M., T. D. Laser and N. B. Hendriksen. 2001. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. FEMS Microbiol. Lett. 202: 209-213.
- Kim, H. J., D. S. Lee and H. D. Paik. 2004. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from raw soybean sprouts. J. Food Protect. 67: 1031-1035.
- Kim, S. H., J. S. Kim, J. P. Choi and J. H. Park. 2006. Prevalence and frequency of food-borne pathogens on unprocessed agricultural and marine products. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 594-598.
- Kramer, J. M. and R. J. Gillbert. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. pp. 21-70. In: Food-borne Bacterial Pathogens. Doyle MP(ed). Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Lee, E. S., H. M. Kang, C. I. Chung and J. S. Moon. 2007. Antimicrobial susceptibility and prevalence of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis. Korean J. Vet. Res. 47(1): 67-75.
- Lee, J. Y., H. A. Kim, H. S. Kim and S. Y. Ryu. 2013. A case of Infective Endocarditis and Meningitis Caused by *Streptococcus agalactiae*. Korean J. Med. 85(4): 435-438.
- Löwdin, E., I. Odenholt-Tornqvist, S. Bengtsson and O. Cars. 1993. A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 2200-2205.

- Lund, B. M. 1990. Food-borne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet* 336: 982-986.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement. NCCLS Document M100-S18. Wayne, PA: NCCLS.
- Phelps, R. J. and J. L. McKillip. 2002. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microb.* 68: 3147-3151.
- Piek, T. 1986. *Venoms of the Hymenoptera*. London, Academic Press.
- Rubin, B. K. 2008. Aerosolized antibiotics for non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 21: 71-76.
- Schwalbe, R., L. Steele-Moore and A. C. Goodwin. 2007. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. CRC press. Boston.
- Seo, M. H., Y. H. Na, D. H. Lee and J. H. Kim. 2016. A Case of Successful Treatment Using Topical Colistin in Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bacterial Ulcer. *J. Korean Ophthalmol. Soc* 57(8): 1307-1311.
- Wu, M. and R. E. Hancock. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 274: 29-35.
- Yoo, H., S. W. Park, C. Y. Hwang, H. Y. Youn and H. R. Han. 2002. Aerobic antimicrobial susceptibility patterns of bacteria isolated from dog. *J. Vet. Clin.* 19: 303-311.