

## 식품 보존 스트레스에서의 식중독세균의 생체막 생성

이노아 · 노봉수<sup>1</sup> · 박종현\*

경원대학교 분자 · 식품생명공학과, <sup>1</sup>서울여자대학교 식품미생물공학과

## Biofilm Formation of Food-borne Pathogens under Stresses of Food Preservation

No-a Lee, Bong Soo Noh<sup>1</sup>, and Jong-Hyun Park\*

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

<sup>1</sup>Department of Food and Microbial Technology, Seoul Woman's University

**Abstract** Most bacteria form biofilm as self-defence system, making efficient food sanitization, preservation, and instrument washing more difficult. Biofilm formation of *Salmonella*, *E. coli*, *B. cereus*, and *S. aureus* was observed during 24 hr food preservations by performing microtiter plate and glass wool assays. Most cells formed biofilm and attached onto glass wool. When biofilm formation and injury were analyzed on the microtiter plate, 10 and 20% acid-injured *E. coli* and *S. aureus*, respectively, 30-50% cold temperature (4°C)-injured *B. cereus* and *E. coli*, and 30-55% 6% sodium chloride solution-injured *Salmonella* showed significant biofilm formation. Results indicate biofilm formation level differed within species depending on type of stress.

**Key words:** biofilm, food-borne pathogen, preservative stress, microtiter plate assay, glass wool assay

### 서 론

미생물은 배지에서 생육할 때와는 달리 식품에 오염되어 존재할 때 식품성분과 그 환경으로부터 필요한 영양원을 얻을 뿐만 아니라 동시에 스트레스(stress)도 받게 된다. 이때 미생물은 이러한 환경적 stress에 대한 방어기작으로 일시적인 변화(temporary change) 혹은 돌연변이(mutation)를 통해 적응(adaptation)하거나, 생체막(biofilm) 등을 형성하는 것으로 외부방어 조절장치를 갖게 된다(1). 이중 biofilm은 미생물이 표면에 polysaccharide의 matrix 구조로 부착하여 생기게 되는 생장형태라고 할 수 있다(2). 초기의 환경분야에서의 연구에서는 polymer로 이루어진 파이프에서 많이 관찰되는데 물속의 세균이 고체 표면에 부착하여 미세 집락(microcolony)를 이루고 그 덩어리가 차츰 커져서 막을 이루어 biofilm을 형성하게 된다. 이 표면에 세균이 부착한 후 pili, lipopolysaccharide O 항원이나 teichoic acid, exopolysaccharide 등으로 덮이게 된다. 이 과정의 초기에 세균 세포가 exopolysaccharide인 glycocalyx polymer를 가지고 표면에 부착하고 세포 분열을 계속하여 biofilm을 형성하게 된다.

Biofilm 실험에 대한 연구는 microtiter plate assay(5)를 이용하여 biofilm과 관련된 대사 factor들에 대한 연구가 진행되었고 *Bacillus*

를 glass wool을 이용하여 biofilm을 assay하여 단백질 분석하는 분자생물학적 실험을 주를 이루었다(6). 그러나 biofilm에 관한 많은 연구는 해양 미생물과 관련하여 이루어 졌고(7) 식품에서는 식품성분의 stress보다는 단독stress로 인한 adaptation관련 실험이 많이 있어 왔다(8).

Polyvinyl chloride(PVC), Teflon, Plexiglas, wool, rubber와 stainless steel에서 *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*와 *L. monocytogenes*은 부착하지 않은 cell에 비해 quaternary ammonium compound (QAC) sanitizer에 저항력을 가지고 있으며(9), *Candida albicans*의 antifungal agent 실험에서는 부유균(planktonic cell)에 비해 biofilm의 MIC값이 더 높았다고 한다(10). 이와 같이 biofilm은 식품 가공과정에서 쉽게 형성되며 강한 부착력으로 단세포(mono cell)에 비해서 제거가 어려울 뿐만 아니라 생존에 필요한 virulence factor를 분비하게 되고 이 virulence factor가 식품에 유입되면 독성을 질로 작용하게 된다. 이와 같은 예로 *S. aureus*의 biofilm 형성과정에 agr system은 α-hemolysin을 분비하여 독성을 질로 작용했다고 한다(11). 열처리로부터 살아남은 세균이거나, 또는 식품중의 산과 염, 온도등 자연적으로 가해진 stress를 견디어 낸 세균들은 다른 스트레스를 가해도 일부 균주는 cross adaptation특성으로 인하여 식품 속에서 더 독성이 강해지게 된다(3,4). 특히 현대의 식생활 형태가 가능하면 살균등의 가공이 덜되고 천연상태의 식품을 요구하고 있는 상황에서 식중독을 유발할 수 있는 세균들은 이러한 특성으로 인하여 더 중요하게 연구될 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 그 실제적인 중요성에 비하여 연구가 많이 진행되지 못하고 있는 주요 식중독세균의 biofilm 형성여부와 식품저장, 유통, 제조과정에서 받을 수 있는 acid, cold starvation, cold temperature, sodium chloride에 의한 stress가 biofilm 형성에 미치는 영향을 평가하여 그 결과를 보고하고자 한다.

\*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Sujeong-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do 461-701, Korea

Tel: 82-31-750-5523

Fax: 82-31-750-5273

E-mail: p5062@kyungwon.ac.kr

Received October 24, 2005; accepted January 3, 2006

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배양 조건

표준균주로 *Bacillus cereus* KCCM 40935, *Salmonella typhimurium* ATCC 12023, *Staphylococcus aureus* ATCC 12103, *Escherichia coli* O157:H7 932를 사용하였다. 분리균주(wild type)로는 당 연 구실에서 분리 동정한 *B. cereus* B70C, *B. cereus* B72C, *B. cereus* B74C, *B. cereus* B75C와 *S. aureus*는 *S. aureus* S6T, *S. aureus* S14T, *Salmonella*는 *Salmonella* S2A, *Samonella* S6A, *Samonella* S9A를 사용하였으며 *E. coli*는 *E. coli* E1C, *E. coli* E2C, *E. coli* E3C를 사용하였다. 모든 배양은 tryptone soya broth(Oxoid, Hampshire, England), tryptone soya agar(Oxoid, Hampshire, England)에서 37°C로 overnight 배양하여 수행하였다.

### 스트레스 노출조건

Acid stress는 균주를 10 mL acid TSB(pH5.3)에 전배양액 100 μL 접종한 후 4°C에서 4시간 동안 배양하였다. Cold stress를 주기 위해 균주를 10 mL의 0.1% tryptone peptone broth(Difco, Detroit, MI, USA)에 전배양액 100 μL 접종한 후 2시간 동안 4°C로 및추어 놓은 항온수조에서 배양하였다. 그리고 cold starvation을 위해서는 균주를 15분 동안 원심분리(10,000×g)하여 상등액은 버린 후 pellet을 phosphate buffer saline(PBS)로 혼탁한 후 10일 동안 4°C에 노출하였다. Sodium chloride stress를 위해서 균주가 접종된 10 mL(6% sodium chloride함유)을 4°C에서 45 min동안 배양하였다(12).

### 상해비율 측정

Stress노출조건에 따라 stress를 준 후 각각의 stress조건에 대한 상해 비율을 측정하기 위해 triptone phosphate agar(Difco, Becton, Detroit, MI, USA)와 TPAS(TPA에 4.5% NaCl을 첨가)에 균주를 도말하여 생균수를 측정하였다. TSA와 TPAS에 상해를 준 균주를 십진 희석법으로 도말하여 두 배지간 균수의 차이를 상해비율로 나타내었다(15).

$$\text{Injury}(\%) = \frac{[\text{Log}(CFU/mL) \text{ at TPA} - \text{Log}(CFU/mL) \text{ at TPAS}]}{\text{Log}(CFU/mL) \text{ at TPA}} \times 100$$

### Glass wool에 의한 biofilm 생성분석

$10^3$  CFU/mL의 식중독 세균을 0.5 g의 glass wool(직경 6 mm)이 포함된 100 mL tryptone soya broth(Difco, Becton, Detroit, MI, USA)에서 37°C에서 48시간 배양하였다. 그 후 부유세균을 제거하기 위해 무균 핀셋을 사용하여 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 bead를 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 혼탁하여 생균수를 측정하였다(13).

### Microtiter plate에 의한 biofilm 생성 측정

Stress를 준 균주를 십진 희석을 하여 10 mL TSB 배지에 100 μL 분주하였을 때  $10^2$  CFU/mL가 되도록 만든 후 PVC microtiter plate(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N.J., USA) 각

96 well에 200 μL씩 각각 분주하였다. 24시간 동안 37°C로 배양한 후에 각 well의 배지 상등액을 aspiration으로 제거하였다. 그 다음 생리식염수(0.85% NaCl)로 세 번 세척하고 99% methanol 200 μL으로 15 min 처리하여 균주를 고정시켰다. 건조 후 2% Hucker crystal violet용액 200 μL으로 5분 동안 well 안에 부착된 균주를 염색하고 멸균수로 세척한 뒤 건조시켰다. 이어서 3% glacial acetic acid를 160 μL씩 첨가하여 5분 동안 처리하여 cell내로부터 유리되는 crystal violet을 550 nm에서 microtiter plate reader(Tecan, sunrise, A Graham, Salzburg, Austria)로 흡광도를 측정하였다(14).

## 결과

### 식중독세균의 biofilm 형성

외부 스트레스에 대한 biofilm생성정도를 알아보기 전에 이들 세균이 biofilm을 형성하는지를 glass wool로 분석하였다. *E. coli* O157:H7 932, *Sal. typhimurium* ATCC 12023, *B. cereus* KCCM 40935, *S. aureus* ATCC 12103를 glass wool에 부착되어 있는 세포와 glass wool에 부착되지 않은 부유세포를 시간대 별로 측정하였다(Fig. 1A, 1B). *S. aureus*가 부착 상태에서 가장 많은 증가 추세를 보였지만 부유세포와 glass wool에 부착된 세포의 생장곡선은 균주마다 특별한 차이가 없이 24시간 이후에도 많이 증가하는 것을 알 수 있었다. 사용한 균주 모두 12시간 대까지는 균수가 증가하였는데 planktonic cell은 12시간 이후에는 정지기로 더 이상 증가하지 않은 것으로 나타났다. 그러나 흥미롭게도 glass wool에 부착된 세포는 12시간 이후에도 계속 증가 추세를 보였다. 이는 biofilm으로 부착된 세포는 biofilm내에서 계속 증식 이루어지거나 혹은 부유세포 일부가 biofilm을 생성하면서 glass wool에 부착되는 것으로 보인다. *Bacillus*의 경우 2시간이 지나면

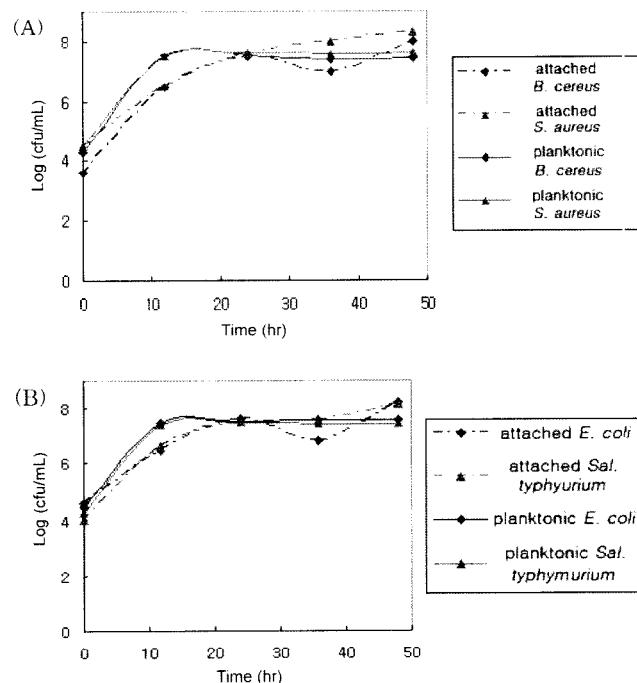
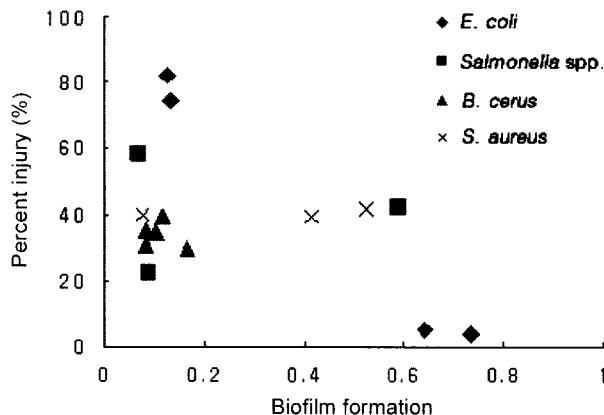


Fig. 1. Viable counts of attached cell on glass wool and planktonic cell of food borne pathogens under non-stress. Symbols: attached cell (- - -), planktonic cell (—). A: *E. coli* O157:H7 932, *Sal. typhimurium* ATCC 12023, B: *B. cereus* KCCM 40935, *S. aureus* ATCC 12103.



**Fig. 2. Injury percentage and biofilm formation of food-borne pathogens under acid stress.** The cell forming biofilm was detected in the microplate well by detecting the dye at 550 nm absorbance.

glass wool에 부착하기 시작하여 18시간 정도에는 부착된 균주가 모여 biofilm의 형태로 관찰된다(16). 따라서 이들 세균들이 glass wool에 부착하는 것으로 볼 때 여기서 연구한 식중독균은 대부분이 일정양의 biofilm을 형성하는 것을 알 수 있었다.

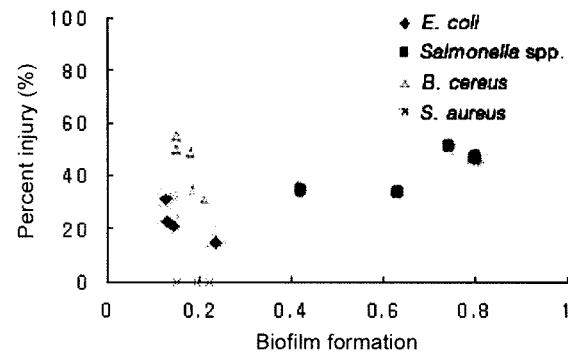
Stress상해를 준 것에 대한 대조구로써 상해를 주지 않은 균의 biofilm형성을 microplate에서 흡광도( $OD_{550}$ )으로 비교해 보았다(결과 미제시). 보통 스트레스를 주지 않은 균주인 경우에 microplate에서는  $OD$ 값이 0.2 정도로 많은 biofilm이 형성되는 것으로는 보이지 않았고 injury는 거의 없는 것으로 나타났다. 이때 같은 종이라도 strain에 관계없이 부착정도가 각기 다르게 나타났다.

#### 상해종류별 식중독 세균의 biofilm생성

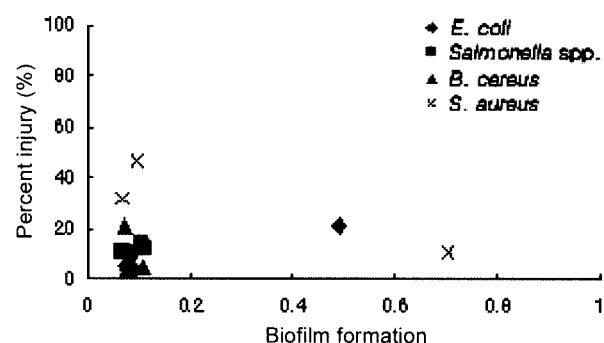
**Acid stress에 의한 영향:** 약 산이나 약 알칼리 상태에서는 내성이 생겨 오히려 생장이 더 촉진될 수 있으며 pH에 의한 stress 적용 시간은 보통 30-60분 정도의 짧은 적응 시간을 갖는다고 한다(17). 따라서 pH 5.3의 acidic TSB상에서 4시간 동안 노출하여 stress를 준 다음 TPAS와 TPA배지간 균수의 차이를 이용하여 injury%를 계산하였다(Fig. 2).

*B. cereus*는 산에 노출되었을 때 실험 5균주 중 5균주 모두가 20% 이상의 injury를 보인 반면 biofilm은 모두 형성하지 않았다. 그리고 *Salmonella*도 20% 이상의 상해는 받았지만 역시 biofilm의 형상은 4균주 중 1균주만 형성하는 것으로 나타났다. *E. coli*는 4균주 중 2균주는 injury만, 2균주는 biofilm만을 형성하는 것으로 나타나 서로 전혀 다른 경향을 보여 주었다. Stress를 받아 대조구보다 높은 biofilm 형성도를 보인 *E. coli* E2C, *E. coli* E3C와 *S. aureus* S14T의 몇 균주는 stress에 대한 적응기작이 크게 일어난 것으로 보인다. 따라서 이들 4 식중독 세균중 대부분은 산에 20%이상의 injury는 받았으나 biofilm은 일부만이 형성하는 것으로 나타났다.

**Sodium chloride stress에 의한 영향:** 식품 내에 식품살균보존을 위하여 일반적으로 사용되는 6% sodium choloride로 stress를 준 다음 그것에 따른 injury와 biofilm 형성도를 비교하였다. *S. aureus*는 내염성 균이지만 대부분의 균주가 20% 이상의 상해를 받은 것으로 보였고 모두 동시에 biofilm을 형성하는 것으로 나타났다. *Bacillus*와 *E. coli*는 injury는 받았지만 전혀 biofilm을 생성하지는 않는 것으로 보였다. *S. aureus*는 injury와 biofilm을 전



**Fig. 3. Injury percentage and biofilm formation of food-borne pathogens under sodium chloride stress.** The cell forming biofilm was detected in the microplate well by detecting the dye at 550 nm absorbance.



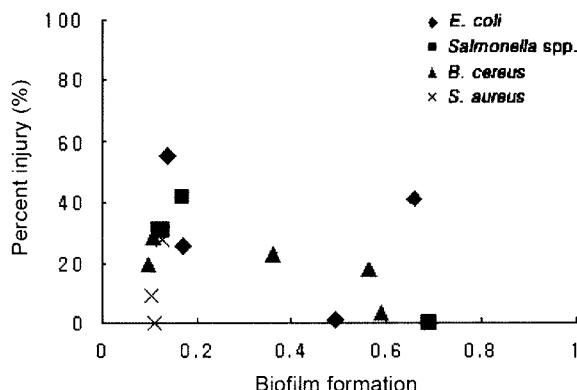
**Fig. 4. Injury percentage and biofilm formation of food-borne pathogens under cold starvation stress.** The cell forming biofilm was detected in the microplate well by detecting the dye at 550 nm absorbance.

혀 형성하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 stress는 특히 *Salmonella*에게 많은 영향을 미치고 있는 것으로 분석되었다(Fig. 3).

**Cold starvation에 의한 영향:** 기아상태로 만들어주기 위해 수돗물(tap water), 이온수(deionized water) 또는 식염수(saline), 그리고 phosphate buffered saline을 사용하였다. 대체적으로 normal saline이나 tap water보다는 0.3 mM의 phosphate buffered saline을 사용했을 때에 좀더 빠른 기간 내에 cell의 사멸을 보인다고 한다(20). 이번 실험은 사멸보다는 injury에 따른 biofilm 형성도를 보는 것이기 때문에 0.1 M의 phosphate buffered saline을 사용하여 균주를 5일간 4°C에 노출시켰다(Fig. 4).

*Salmonella*에서 10-15%, *E. coli*, *B. cereus*에서는 5-20%로 낮은 percent injury를 보였다. *S. aureus*는 25-48% 정도의 상해를 받았다. Injury에 따른 biofilm형성 여부는 type strain과 비교해 보았을 때 *S. aureus* S14T, *E. coli* E3C 각 한 균주를 제외하고는 type strain보다는 낮은 biofilm 형성도를 나타내었다. 대체적으로 *S. aureus*만이 cold starvation 상태에서 injury와 biofilm의 형성을 하는 균주인 것으로 나타났다. Starvation상태에서는 균이 biomass상에서 더 이상의 증가는 없고 분열 현상만 있어서 cell의 크기는 줄어든다고 한다(21). 따라서 외부의 stress에 대한 biofilm의 형성은 미미했던 것으로 보인다.

**Cold temperature에 의한 영향:** Cold shock을 받았을 경우 0-60% 정도로 4식중독 세균의 세균별 특별한 차이없이 percent injury는 다양하게 나타났으며 다른 injury 수준과 비교해 보았을



**Fig. 5. Injury percentage and biofilm formation of food-borne pathogens under cold stress.** The cell forming biofilm was detected in the microplate well by detecting the dye at 550 nm absorbance.

때 특이할 만한 차이점은 없었다(Fig. 5). *Salmonella*는 injury와 biofilm 형성 균주가 서로 다르게 나타났고, *E. coli*도 대체적으로 injury는 받았지만 biofilm 형성은 더 적게 일어나는 것으로 보였다. 한 개의 균주만이 injury와 biofilm 형성을 동시에 보이고 있었다. *B. cereus*는 대체적으로 낮은 정도의 injury는 받았지만 biofilm 형성 균주는 많지 않았다. 특히 한 개의 균주는 injury를 받지 않고 biofilm만을 형성하는 것으로 나타났다. *S. aureus*는 injury와 biofilm의 형성이 잘 일어나지 않는 것으로 나타났다.

이러한 cold temperature에서의 stress는 식중독 세균의 strain간에 아주 다양한 반응현상을 보여 주고 있는 것으로 나타났다.

## 고 찰

미생물으로부터의 식품의 안전성을 확보하기 위하여 식중독 세균을 식품으로부터 제거하는 많은 노력이 오래 전부터 이루어져 왔다. 그러나 이러한 노력을 의도되었던 바와 같이 효율적으로 이루어지지 않은 것이 사실이다. 이러한 원인중의 하나가 오염된 식품에서 이 세균들은 biofilm을 형성하여 외부의 stress에 대항하기 때문인 것으로 알려지고 있다(2) 따라서 본 연구에서는 식품의 보존으로 많이 활용되고 있는 산, 저온, sodium chloride 등에 따른 식중독 세균의 상해정도와 biofilm 형성에 대하여 연구하고자 하였다.

식중독 세균으로는 식품에서 많은 문제가 되고 있는 식중독 유발 세균인 Gram(-) 세균인 *Salmonella*와 *E. coli*, 그리고 Gram(+) 세균인 *B. cereus*와 *S. aureus*의 표준균주와 분리균주를 사용하여

분석하였다. Glass wool과 microplate plate에 부착여부로 biofilm 형성을 판단하였고 injury 정도는 각각의 stress 후에 NaCl 배지에서의 생육여부에 따라 판단하였다. 여기서 20% injury를 받은 균주를 상해를 받은 것으로 판단했고, 그리고 microplate에 의한 정량적인 분석에서 biofilm은 OD<sub>550</sub>에서 0.4 이상을 보이는 균주를 biofilm forming strain인 것으로 평가하였다.

일반적으로 여기서 사용된 세균들은 glass wool에 부착되는 것으로 보아 약간의 biofilm은 형성하는 것으로 판단되었다.

Table 1에 의하면 산에 대한 이들 세균의 영향은 대체적으로 *E. coli*를 제외하고는 모두 injury는 받고 있은 것으로 보였고 biofilm 형성은 세균들 간에 약간의 차이는 있는 것으로 나타났다. *S. aureus*가 상대적으로 높은 비율로 biofilm을 형성하고 있었고 injury를 받은 균주 중 약 66%가 biofilm을 형성하였다. *E. coli*는 injury를 보이는 균주와 biofilm을 형성하는 균주가 서로 달랐으며 *B. cereus*는 biofilm 잘 형성하지 않는 것으로 나타났다.

Sodium chloride에 의한 stress에서는 모두 injury를 받았으나 이 때 *S. aureus*를 전혀 injury를 받지 않았다. 흥미롭게도 *Salmonella*만 biofilm을 형성하였고 다른 세균은 biofilm을 형성하지 않았다. 이는 현재 식품의 살균제로 가장 많이 사용하고 있는 chlorine compound에 *Salmonella*의 저항성이 크다는 것을 의미하므로 향후 많은 주의를 기울여야 할 것으로 보인다. Cold starvation 조건에서는 *S. aureus*만이 injury와 biofilm을 형성하고 있었다.

그리고 4°C의 cold temperature stress에서는 *E. coli*가 가장 가장 많은 injury와 biofilm을 형성하고 있는 것으로 나타났다. Gram(-)인 *Salmonella*와 *E. coli*가 외부의 stress에 대하여 비교적 높은 biofilm 형성능을 보여 주었는데 특히 sodium chloride에 대한 biofilm 형성 능은 아주 높았다. Gram(+)인 *S. aureus*는 특히 산에 대한 biofilm 생성성이 높은 것이 나타났다. *Salmonella*는 biofilm 형성으로 stress 중에서 특히 sodium chloride에 더욱 저항력이 생기며 이를 다른 식중독 세균과 비교되는 특징으로 여겨진다(22). 이러한 특징은 현재 식품산업에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 살균제가 이 *Salmonella*에는 효과가 크지 않다는 것을 시사한다.

*P. fluorescens* 그리고 *B. cereus*는 chlorine, iodophor, peracetic acid, acid anionic과 fatty acid sanitizer에 의해 동등하게 영향을 받지만 *Y. enterocolitica*의 경우 sanitizer를 처리하였을 때 저항력이 생기고 *Staphylococcus*와 *P. aeruginosa*는 산이나 알칼리에서 고압 스프레이로 세척을 할 때도 biofilm 제거에 효과가 없었다고 한다(18). *E. coli* O157:H7는 chlorine과 peroxyacetic acid sanitizer를 처리 하였을 때 효과적으로 세균의 수를 줄일 수 있지만 사멸되지 않고 생존하는 균은 강화 또는 상해를 입는 경우도 있다고 한다(19).

**Table 1. Characteristic analysis of injury and biofilm formation of food-borne pathogens under each stress of acid, sodium chloride, cold starvation, or cold temperature**

Stress	<i>Salmonella</i>			<i>E. coli</i>			<i>B. cereus</i>			<i>S. aureus</i>		
	I <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>	I+B	I	B	I+B	I	B	I+B	I	B	I+B
Acid	100*	25	25	50	50	0	100	0	0	100	66	66
Sodium chlorine	100	100	100	75	0	0	100	0	0	0	0	0
Cold starvation	0	0	0	0	25	25	0	0	0	66	33	0
Cold temperature	66	33	0	75	502	5	40	40	20	33	0	0

Symbols: I = injured strain, B = biofilm forming strain, I+B = injured+biofilm forming strain.

\*The number was expressed as percentage (%) for each strain of total strains, and four strains of *Salmonella*, four of *E. coli*, five of *B. cereus*, and three of *S. aureus* were tested.

<sup>1)</sup>Injured strain was defined as more than 20% injury on the Figures.

<sup>2)</sup>Biofilm forming strain was defined as more than 0.4 absorbance of OD<sub>550</sub>.

따라서 같은 종의 식중독 세균이라도 여러 가지 외부의 stress 대하여 매우 다양한 정도의 biofilm을 생성하는 것으로 보인다. 따라서 현대의 소비자 need에 부응하는 식품으로부터 이들 세균을 제어하기 위해서는 각 식품별 주된 식품 살균보존형식에도 한 개보다는 여러 물리, 화학적인 살균 보존제를 이용하는 hurdle concept을 이용할 필요가 있을 것으로 보인다.

## 요 약

세균이 외부stress에 대한 자가저항으로 biofilm형성을 하는 것은 식품 뿐만아니라 식품기기등의 세척, 소독등의 식품안전 확보에 많은 어려움을 주게 된다. 본 연구에서는 glass wool과 microtiter plate assay를 이용하여 주요 식중독 세균인 *Salmonella*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*를 여러가지 식품보존하에서 상해와 biofilm형성 정도를 비교하였다. 이들 세균은 외부의 stress없는 조건하에서도 상해를 받지 않았고 모두 biofilm이 형성되어 glass wool에 부착되었다. Microtiter plate assay에서의 상해별 biofilm형성은 acid stress에서 10%이내의 상해를 받은 *E. coli*와 약 40%의 상해를 받은 *S. aureus*에서 높게 나타났다. 4°C의 cold temperature에서는 30-50% 상해를 나타낸 *B. cereus*와 *E. coli*가 높은 biofilm 형성을 보였고 cold starvation에서는 다른 stress에 비해 전체적으로 biofilm형성도가 낮은 값으로 측정되었다. 그리고 6% sodium chlorine solution에서 30-55%의 상해를 입은 *Salmonella*가 높은 biofilm 형성도를 보였다. 그러나 같은 종의 식중독 세균이라도 외부의 stress 대하여 다양한 정도의 biofilm을 생성하는 것으로 보인다. 따라서 식품으로부터 이들 식중독 세균을 제어하기 위해서는 대상식품의 보존환경에 따른 biofilm 형성특성을 고려해야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발사업(과제번호:02-PJ1-PG1-CH08-0002)의 지원으로 이루어졌으며 이에 저자들은 사의를 표하고자 합니다.

## 문 헌

- Hengge R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. Curr. Opin. Microbiol. 2: 148-152 (1999)
- Costerton JW, Cheng G, Geesey TI. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41: 435-464 (1987)
- Res TJ, Frank JF. Susceptibility of starved planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizer as determined by direct viable and agar plate count. J. Food. Prot. 56: 573-576 (1993)
- Pickett E, Murano EA. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers after exposure to a chemical shock. J. Food Prot. 59: 374-378 (1996)

- O'Toole, GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceed via multiple, convergent signaling pathways: A genetic analysis. Mol. Microbiol. 28: 449-461 (1998)
- Stanley NR, Britton AD. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. J. Bacteriol. 185: 1951-1957 (2003)
- Långmark J, Michael V. Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. Appl. Environ. Microbiol. 71: 706-712 (2005)
- Jee-Hoon R, Larry R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 71: 247-254 (2005)
- Somers EB, Schoeni JL. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. Int. J. Food Microbiol. 22: 269-276 (1994)
- Srinivasan R, Stewart PS, Griebe T. Biofilm parameters influencing biocide efficacy. Biotechnol. Bioeng. 46: 553-560 (1995)
- Nicky C, O'Toole GA. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 185: 3214-3217 (2003)
- Soot LM, Pierson MD. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. J. Food Prot. 61: 1293-1298 (1998)
- Marinda C, Theron J. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2770-2780 (2002)
- Djordjevic M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2950-2958 (2002)
- Taormina PJ, Beuchat LR. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2555-2563 (2001)
- Basar T, Guermonprez P. Delivery of CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2770-2780 (2003)
- Rowbury RJ. Cross-talk involving extracellular sensors and extracellular alarmones gives early warning to unstressed *Escherichia coli* of impending lethal chemical stress and leads to induction of tolerance responses. J. Appl. Microbiol. 90: 677-695 (2001)
- Mosteller TM. Sanitizer efficacy toward attached bacteria in a simulated milk pipeline system using pure and mixed cultures. Dissertation Abstracts Int. 54: 4978-B (1993)
- Farrell BL. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. J. Food Prot. 61: 817-822 (1998)
- Wang G, Doyle M. Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. J. Food Prot. 61: 662-667 (1998)
- Flahaut S, Frere J, Auffray Y. The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress proteins. Lett. Appl. Microbiol. 26: 259-264 (1998)
- Keren S, Romling U, Yaron S. Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1163-1168 (2005)