

*Cronobacter sakazakii*의 생육 억제와 바이오필름 저감화를 위한 박테리오파지 적용

이영덕*

서원대학교 식품공학과

Application of Bacteriophages for Growth Inhibition and Biofilm Reduction of *Cronobactersakazakii*

Young-Duck Lee*

Department of Food Science and Engineering, Seowon University

Abstract

Cronobactersakazakii is a newly emerging high hazard pathogen, which causes encephalomeningitis and necrotic colitis. Recently, successful biocontrol of harmful microorganisms in several foods through the use of bacteriophages has been reported. In this study, bacteriophages were isolated from kimchi and sewages. Morphological analysis by TEM indicated that phages belonged to the *Myoviridae* family. In case of heat stability, KCES2 and ESP 2949-2 phages were susceptible to temperatures above 70°C. KCES2 and ESP 2949-2 phages inhibited the growth of *C. sakazakii* in culture broth. When KCES2 and ESP 2949-2 phages were applied to biofilm-formed *C. sakazakii*, *C. sakazakii* was efficiently reduced. Therefore, newly isolated KCES2 and ESP 2949-2 phage for *C. sakazakii* might effectively reduce *C. sakazakii* in various foods.

Key words: *C. sakazakii*, bacteriophage, growth inhibition, biofilm reduction

서 론

*Cronobacter sakazakii*는 자연계에 널리 분포하는 세균으로 Enterobacteriaceae과의 간균으로 그람 음성, 통성혐기성, 그리고 포자를 형성하지 않는 특성을 갖고 있다(Farber et al., 2008). *C. sakazakii*는 과거에는 *Enterobacter sakazakii*로 명명되다가 Iversen et al. (2006)에 의해 *Cronobacter* spp.로 새롭게 분류되었다(Iversen et al., 2006). *Enterobacter* spp. 중 *E. cloacae*, *E. agglomerans*와 더불어 *Cronobacter* spp.는 대표적인 병원성 세균으로 알려져 있으며(Urmenyi et al., 1961), 최근 들어 분유 등 영유아식에 오염되어 영유아에게 치명적인 질환을 유발시키기 때문에 제어가 필요한 병원성 세균으로 주목 받고 있다(Gurtler et al., 2005).

영유아의 급식용으로 사용되는 조제분유와 이유식은 비살균 공정으로 생산되는 식품이므로 *C. sakazakii*에 의해

오염되기 쉽고 실제 한국의 영 유아 식품에서의 오염도가 약 20%에 달하는 것으로 보고되었다(Jung & Park, 2006). Muijtens et al. (1988)은 가장 높은 오염원으로 알려진 건조 유제품을 35개국에서 141개의 조제분유를 수집하여 분석한 결과 14.2%의 오염율을 보였다고 보고하였다(Muijtens et al., 1988). 이처럼 *C. sakazakii*는 조제분유 혹은 유아식에서 주로 검출되는 것으로 알려져 있으나 그 외에도 *C. sakazakii*는 토양, 쥐, 파리, 우유분말공장, 초콜릿 공장 및 집 등 주변 환경에서 자주 검출되는 미생물로 보고되었으며 식품공장을 포함한 다양한 인공 환경에서 분리되었다. 식품 중에는 쌀과 빵을 포함하는 곡류식품, 발효 음료, 양배추와 같은 채소류가 있고 자연환경으로는 옥수수, 오이, 레몬 등의 식물 뿌리와 물 토양 등에서 확인되었다(Mahaff & Kloepper, 1997; Cottyn et al., 2001; Soriano et al., 2001). 또한 그 외에도 치즈, 육류, 허브, 향신료를 포함한 식품에 널리 분포되어있다(Adamson et al., 1981; Farber et al., 2008).

*C. sakazakii*의 위험성이 높아짐에 따라 *C. sakazakii*의 영유아식품에서의 제어 연구가 진행되고 있다. *C. sakazakii*는 낮은 Aw에서는 높은 수분활성도에 비해 더 오래 생존한 것으로 나타났는데 습도가 낮을수록 *C. sakazakii*의 생

*Corresponding author: Young-Duck Lee, Department of Food Science and Engineering, Seowon University, 377-3 Musimseoro, Seowon-gu, Cheongju, Chungbuk, 28674, Korea
Tel: +82-43-299-8472; Fax: +82-43-299-8470
E-mail: ydlee@seowon.ac.kr

Received January 21, 2016; revised February 4, 2016; accepted January 30, 2016

존율이 높은 것으로 알려져 있다(Breeuwer et al., 2003). 또한, *C. sakazakii*의 기능적으로 다른 유전자 중 건조 stress에 관여하는 유전자가 발현되기 때문이라고 보고되었다(Gurtler et al., 2005). 그리고, Barron과 Forsythe는 *C. sakazakii*는 30개월간 건조 조제분유에서 실험한 결과 다른 장내 세균들 보다 건조내성이 크다고 보고하였다(Barron et al., 2007). 또한 Edelson-Mammel et al. (2005)은 조제 분유의 높은 영양성분으로 인해 700일 이상 bacterial cell의 생존이 가능하다고 보고하였다. 또한 Gurtler & Beuchat, (2007)은 *C. sakazakii*가 건조 시에 Aw가 감소할수록 생존률이 높다고 보고하였다(Gurtler & Beuchat 2007). 이렇게 *C. sakazakii*가 분말형 건조식품이나 환경 등에 오염이 높게 보고되는 것은 *C. sakazakii*가 다른 미생물 혹은 다른 Enterobacteriaceae 중에 비하여 삼투압과 건조 스트레스에 높은 저항성을 가지기 때문이다(Lehner & Stephan, 2004). 또 다른 원인으로서는 *C. sakazakii*의 biofilm 형성능력을 들 수 있는데 biofilm은 물리적 장벽을 형성함으로써 UV light, 삼투압 스트레스, 열처리, 영양고갈, 산, 세정액, 항생제 등의 환경스트레스에 대하여 저항성을 높여준다(O'Toole et al., 2000). Lehner et al. (2005)은 56종의 *C. sakazakii* 중 23종의 균주가 유리표면에서, 33개 균주가 air-solid 표면에서, 16종의 균주가 두 가지 표면에서 모두 biofilm을 형성하는 것을 확인하였다.

이러한 *C. sakazakii*와 biofilm 제어를 위해 열처리 등의 물리적 방법이나 화학적 살균소독제 등이 사용되어 왔으나 그 효과가 식품에서는 크지 않은 것으로 알려져 있다. 아울러 소비자는 가능하면 최소의 열처리 등의 가공을 원하므로 새로운 천연 식품보존 및 살균제의 개발이 요구되고 있다. 이에 따라서 천연항균제, 박테리오파지, endolysin 등이 새롭게 제안되고 있다(Clark et al., 2006). 그 중 박테리오파지는 세균만을 감염시키는 선택성을 가지고 있고 식품 및 자연 환경 속에 아주 많이 분포하고 있으므로 잘 활용하면 훌륭한 식중독 세균 천연제어 방법이 될 수 있으리라 사료된다(Brussow et al., 2005). 최근에는 미국 FDA에서 닭고기 등의 즉석섭취 식품에 *Listeria monocytogenes* 파지의 실용화가 승인(www.ebfoodsafety.com) 되었고, *E. coli*와 *Salmonella enterica* 제어 파지 제품이 승인되어 활용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 *C. sakazakii*의 제어를 위한 박테리오파지를 김치와 오수 시료로부터 분리하여 특성을 분석하고 *C. sakazakii*의 생육 억제 및 biofilm 저감화 효과를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시료

시료는 다양한 미생물들이 존재하고 있는 김치와 오수를

선택하였다. 경기도 재래 시장에서 시판 중인 김치와 성남 시 하수처리장으로부터 오수를 채취한 후 실험실에서 -80°C에 보관 후 박테리오파지의 분리에 사용하였다. 실험에 사용된 균주는 *C. sakazakii* ATCC29544와 기 분리된 100주의 야생형 *C. sakazakii*를 사용하였으며(Lee et al., 2010; Lee et al., 2012), DFI agar (Oxoid, Hampshire, UK)에 각각 평판 희석하고 37°C에서 배양한 후 단일 집락을 Luria Bertani broth (Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)에 접종하고 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다. 배양된 균주를 10 mM CaCl₂ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 LB broth (LBC)에 접종한 후 동일한 조건으로 배양하고 실험에 사용하였다.

박테리오파지 분리

시료를 취해 균질화한 후 LBC broth에서 전 배양된 *C. sakazakii*을 약 7-8 log CFU/mL 수준의 배양액을 균질화한 시료에 첨가한 후 24시간 동안 2,000 rpm으로 37°C에서 교반하며 배양하였다. 그리고 10,000 g에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액을 취해 0.22 μm syringe filter (Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 제균한 후 제균액을 double overlay agar법을 통한 plaque 분석을 수행하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 분석을 통해 생성된 plaque의 크기, opaque 정도 등의 형태학적인 특성에 따라 단일 plaque를 취해 다시 plaque 분석을 하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 박테리오파지의 증식과 농축은 Sambrook et al. (2001)에 의한 방법에 준하여 수행하였다.

숙주저해특성

순수 분리된 박테리오파지를 대상으로 하여 *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *S. enterica* Typhimurium 등의 식중독 세균과 *C. sakazakii* ATCC29533 및 다양한 식품으로부터 분리, 100주의 야생형 *C. sakazakii*에 대해 숙주저해범위를 spot assay를 수행하여 확인하였다. 다양한 식중독 세균들은 Tryptic Soy Broth(Oxoid, Hampshire, UK)에서 3회 이상 계대 배양한 후 LBC broth에 접종한 후 0.1 mL을 취해 LBC soft agar에 분주하고 LBC agar 위에 증충하였다. 그리고 분리된 파지 용액 10 μL를 분주한 후 37°C에서 24시간 배양하고 plaque 형성 여부를 확인하였다.

형태학적 특성 및 안정성

분리된 *C. sakazakii* 박테리오파지의 형태학적 특성을 분석하기 위해 투과전자현미경을 사용하여 검경하였다. PEG 8000 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용해 약 10-11 log PFU/mL 수준으로 농축된 파지를 2% uranyl acetate (Sigma Aldrich)를 이용하여 negative stain을 수행한 후 80 kV 하에서 투과 전자 현미경(Jeol JEM-100S, Japan Electronics and Optics Laboratory, Tokyo, Japan)을

통해 형태학적 특성을 확인하였다. 그리고, 분리된 박테리오파지를 70°C에 노출시키고 처리 시간에 따라 회석하여 plaque assay를 수행한 후 형성된 plaque를 개수하여 열에 대한 안정성을 확인하였으며, 실험은 3회 반복하여 평균으로 나타내었다.

C. sakazakii의 박테리오파지에 의한 생육 억제

분리된 박테리오파지를 사용하여 *C. sakazakii*를 LB broth에서 대수 증식기까지 배양하고, 배양액을 50 mL의 LBC broth에 접종하고 LBC broth에서 다시 대수 증식기까지 배양하였다. 배양 후 50 mL의 LBC broth에 각각 접종하고 MOI (multiplicity of infection)가 약 0.1 수준으로 박테리오파지 혼합액을 접종한 후 시간에 따라 생육 정도를 흡광도 측정하였다. 또한, 박테리오파지를 MOI 약 0.1 수준으로 동일하게 *C. sakazakii* 배양액에 각각 첨가한 후 시간에 따른 생균수를 10진 회석법에 따라 DFI agar에 각각 도말한 후 24시간 이후에 계수하여 생육 억제 효과를 확인하였고, 실험은 3회 반복 실험 후 평균으로 나타내었다.

박테리오파지에 의한 biofilm 형성 C. sakazakii 제어

분리된 24주의 *C. sakazakii*의 biofilm 형성을 위해 12-well plastic plate assay를 수행하였다. Tryptic Soy Broth에 *C. sakazakii*를 접종하여 37°C에서 하루 동안 배양된 배양액을 12-well tissue culture plate의 각 well에 2 mL씩 배양액을 접종한 후 37°C, 48시간동안 배양하였다. 각 조건에서 배양된 plate의 부유세균과 배양액을 aspirator를 이용하여 제거한 후 2.5 mL 식염수로 3회 수세한 후, 형성된 biofilm에 분리된 박테리오파지를 처리한 후 시간에 따른 biofilm의 저감화 효과를 확인하였다. 그리고, 식염수로 수세한 후 2 mL의 99% methanol (Sigma Aldrich)을 각 well에 분주하고 15분 동안 방치하여 biofilm을 표면에 부착시켰다. Methanol 제거 후 완전히 건조시키고 각 well마다 2 mL의 1% crystal violet (Hucker, sigma, USA) solution 분주 후 5분 동안 방치하였다. Crystal violet solution을 제거하고 건조 후 2.5 mL D.W로 1회 washing하고 33%(v/v) glacial acetic acid (Sigma Aldrich)를 1.6 mL씩 분주하여 착색된 crystal violet을 용출시켜 660 nm에서 흡광도의 감소 정도를 측정하여 박테리오파지에 의한 biofilm 저감 효과를 확인하였다. 그리고, 실험은 3회 반복 실험 후 평균으로 나타내었다.

결과 및 고찰

박테리오파지의 분리와 숙주 저해 특성

최근 다양한 연구자들이 *C. sakazakii*의 생물학적 제어제로써 박테리오파지를 적용하고자 하는 연구가 진행되고 있

다(Kim et al., 2007; Lee et al., 2011; Abbasifar et al., 2014). 하지만, 현재까지 다른 식중독 세균들에 비해 박테리오파지를 활용해 *C. sakazakii*의 제어에 응용은 시작 단계에 있으므로, *C. sakazakii*의 제어를 위해 박테리오파지를 적용할 수 있는 다양한 방법에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 김치와 오수로부터 *C. sakazakii*에 대한 박테리오파지를 plaque assay를 수행하여 형성된 plaque 중 크기가 크고 선명한 박테리오파지를 선별하여 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 각각 분리하였다. 분리된 *C. sakazakii*의 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지에 대해 숙주 저해 특성을 확인하기 위해 *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *E. cloacae*, *S. enterica* Typhimurium, *S. enterica* Enteritidis와 분리된 100주의 *C. sakazakii*의 숙주 감염 범위를 확인한 결과는 Table 1과 같다. KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지는 *C. sakazakii*를 제외한 다른 세균에 대해서는 감염시키지 못하는 것으로 나타났다. 또한, 야생형에 *C. sakazakii*에 대해서는 각각 26.3%와 19.3%의 숙주 저해 특성을 확인하였다.

박테리오파지의 형태학적 특성 및 안정성

분리된 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지의 형태학적 특성을 투과 전자 현미경을 통해 확인한 결과 ES2는 *Myoviridae* family에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 세균을 숙주로 하는 바이러스에 일종인 박테리오파지는 형태학적인 특성에 따라 대부분 *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* family에 속하는 것으로 분류되는 것으로 알려져 있다. 특히, *Myoviridae* family에 속하는 박테리오파지는 수축성 tail을 갖는 특성을 가지고 있는 특성을 보유하고 있다(Ackermann, 2007). 최근까지 알려진 *C. sakazakii*의 박테리오파지의 경우 다수가 *Myoviridae* family에 속하는 것으로 보고되고 있다. 그리고, KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지에 대해 70°C에서의 열안정성에 대해 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. KCES2 파지는 70°C에 노출했을 때 약 10분 후에 모두 사멸되는 것으로 나타났으며, ESP 2949-2 파지의 경우는 약 2 log PFU/mL로 감소 후 30분 후 모

Table 1. Host spectrum of KCES2 and ESP2949-2 phage

	KCES2 phage	ESP2949-2 phage
<i>C. sakazakii</i> ATCC29544	○	○
<i>E. cloacae</i> ATCC13047	×	×
<i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC14028	×	×
<i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC13076	×	×
<i>E. coli</i> ATCC25922	×	×
<i>E. coli</i> O157:H7 NCTC12079	×	×
	Infection rate	
<i>C. sakazakii</i> isolates	26.3%	19.3%

○: Infection, ×: No infection

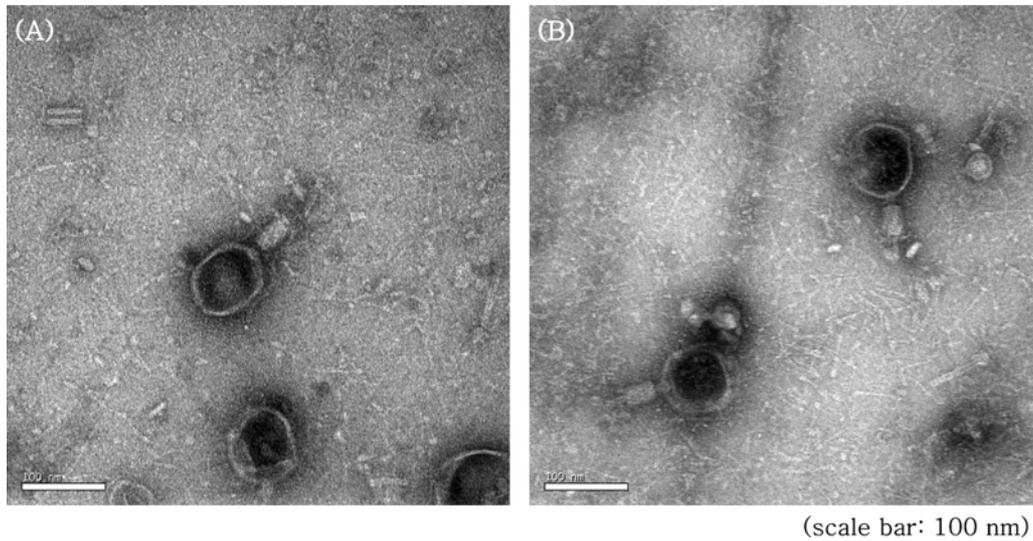


Fig. 1. Morphology of bacteriophage (A) KCES2 and (B) ESP 2949-2 under transmission electron microscopy.

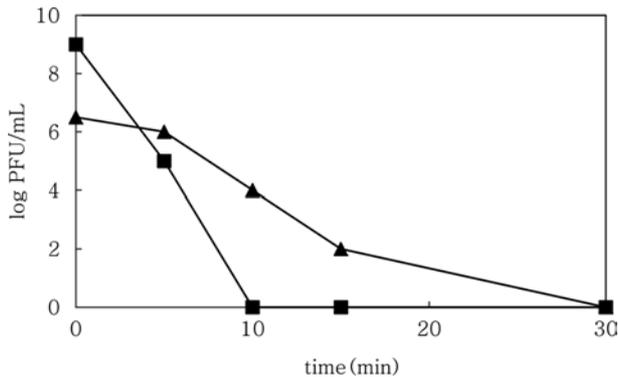


Fig. 2. Heat stability of KCES2 and ESP 2949-2 phage under 70°C. ■: KCES2 phage, ▲: ESP 2949-2 phage.

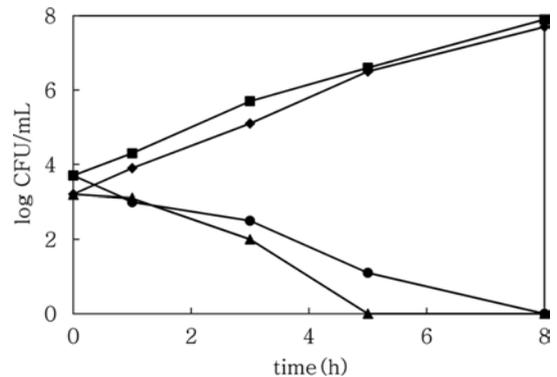


Fig. 3. Viability of *C. sakazakii* ATCC29544 with bacteriophages. ■, ◆: *C. sakazakii*, ▲: *C. sakazakii* with KCES2 phage, ●: *C. sakazakii* with ESP 2949-2 phage.

두 사멸하였다. Lee & Park (2011)이 보고한 *C. sakazakii* 파지의 경우도 30분 후 대부분이 사멸되는 것으로 확인되었다. 기존에 보고된 일부 박테리오파지의 열안정성의 경우는 70°C에서 30분 동안 처리했을 때 약 2-8 log PFU/mL 수준으로 감소되거나 모두 사멸되는 것으로 나타났으며(Buzrul et al., 2007; Li et al., 2010; Coffey et al., 2011; Lee et al., 2015), 일부 박테리오파지의 경우 90°C 이상의 고온에서도 안정한 것으로 보고되었다(Guglielmotti et al., 2011).

C. sakazakii의 박테리오파지에 의한 생육 억제

분리된 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 MOI가 0.1 수준으로 접종하여 *C. sakazakii*에 대한 생육 억제 효과를 확인하기 위해 LBC broth에서 흡광도를 측정하여 확인하였다(data not shown). 그 결과 박테리오파지를 접종하지 않았을 경우는 *C. sakazakii*는 흡광도 값이 약 1.0 수준까지 증가하였으나, KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 각각

접종하였을 경우는 흡광도 값이 약 0.1 수준으로 나타나 생육이 억제 혹은 사멸되는 것을 확인하였다. 또한 분리된 박테리오파지들을 MOI가 약 0.1이 되도록 하여 LBC broth에 접종하고 생육 정도를 DFI agar에 도말하여 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 접종하지 않은 경우 초기 약 3 log CFU/mL에서 8시간 이후에는 약 8 log CFU/mL 수준으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 박테리오파지를 접종하였을 때 KCES2 파지는 약 5시간 이후에 *C. sakazakii*는 확인되지 않았으며, ESP 2949-2 파지는 약 8시간 이후에 검출되지 않았다. 이러한 결과를 통해 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지의 *C. sakazakii*의 생육 억제 특성이 상이함을 확인할 수 있었다. Kim et al. (2007)은 오수 시료로부터 분리한 *C. sakazakii*의 박테리오파지를 이용하여 분유에서 *C. sakazakii*의 저감화를 확인하였으며, Lee & Park (2011)은 돼지분변으로부터 분리된 박테리오파지를 야채 주스와 분

유에 적용하여 *C. sakazakii*의 제어 효과를 확인하였다. 따라서, 본 연구에서 분리된 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 활용하여 식품에 오염된 *C. sakazakii*의 제어를 위한 생물학적 제어제로 적용이 가능할 것으로 사료된다.

박테리오파지에 의한 Biofilm 형성 *C. sakazakii* 제어
본 연구에서 분리한 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 기 분리된 biofilm 형성 *C. sakazakii*들의 제어 효과를 확인하기 위해 microtiter plate assay법을 수행하였다(Fig. 4).

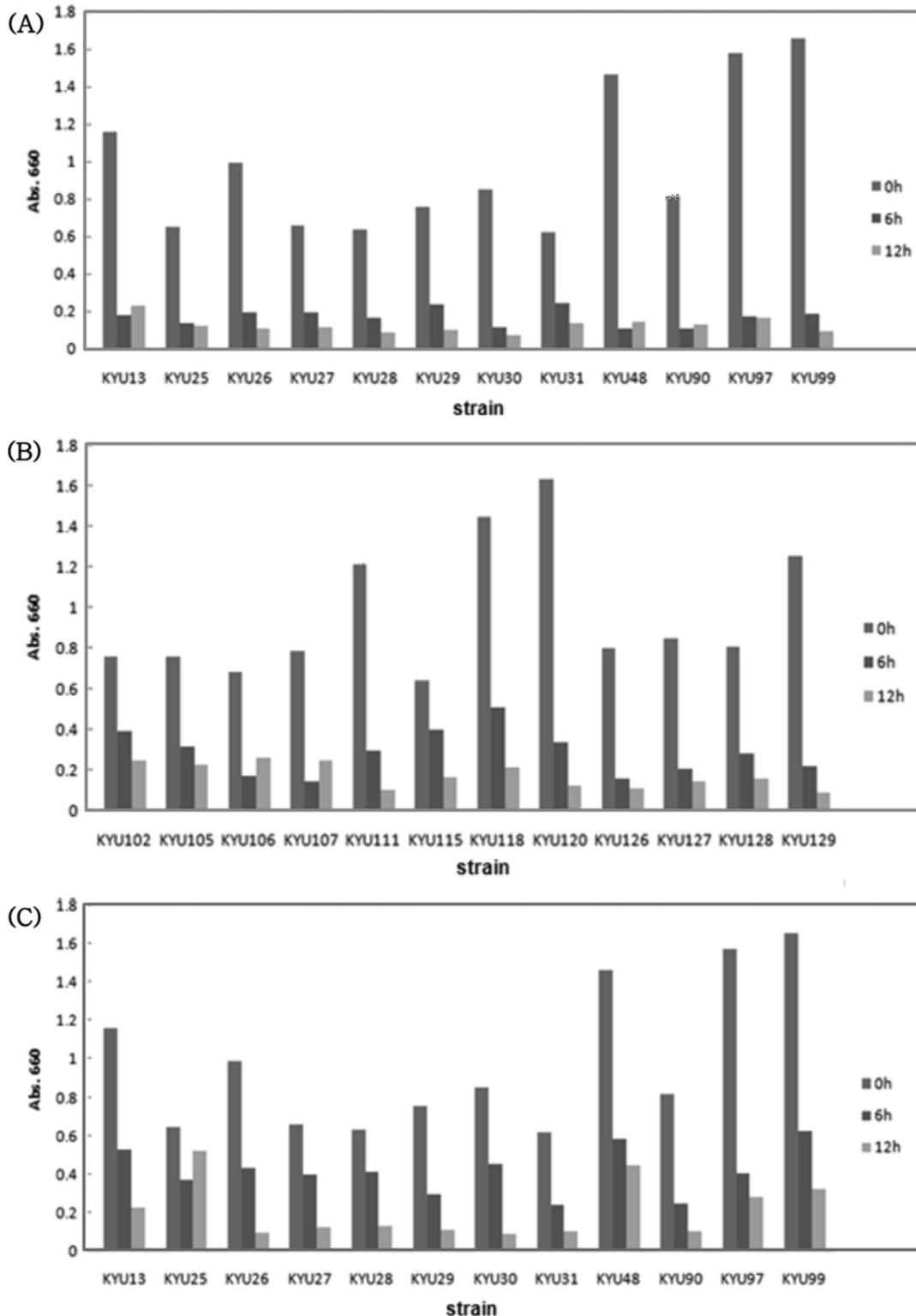


Fig. 4. Reduction of biofilm-formed *C. sakazakii* isolates by (A, B) KCES2 phage and (C, D) ESP2949-2 phage.

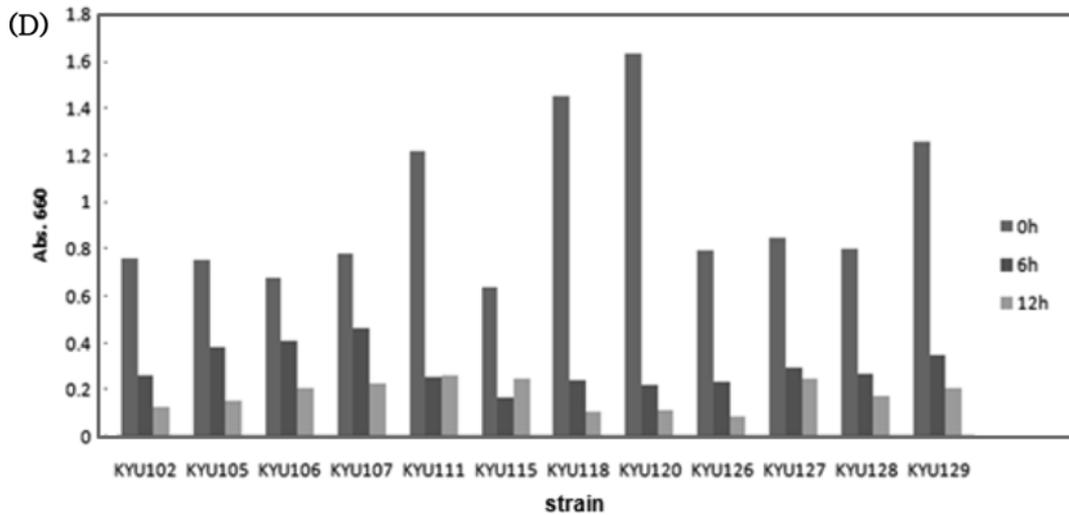


Fig. 4. Continued.

Biofilm 형성능을 확인한 결과 기 분리된 24주의 *C. sakazakii*의 biofilm 생성능은 분리 균주 마다 상이한 것으로 나타났으면, 이는 분리 균주의 생리특성 및 biofilm 형성 조건에 따라 차이가 나는 것으로 판단된다. Biofilm 형성 *C. sakazakii*에 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 각각 처리하여 제어 효과를 확인한 결과 각각의 박테리오파지를 접종한 후 6시간과 12시간 이후에 흡광도 값이 모두 감소하는 것으로 나타났다. Biofilm의 제어를 위해 물리적 방법과 화학적 방법 등이 다양하게 적용되고 있음에도 불구하고 제어가 어려운 것으로 알려져 있다. Biofilm은 미생물이 생물학적 또는 비생물학적 표면에 부착하여 자라면서 형성한 3차원적 구조를 의미하며, 통상적으로 미생물과 미생물이 분비한 extracellular polymeric substance (EPS), 외부에서 부착된 물질들을 통칭한다(O'Toole et al., 2000). Biofilm을 형성한 미생물은 EPS를 분비하여 미생물을 보호하게 되고, 그 결과 열, 낮은 pH, 낮은 수분활성도, 산화제 등의 환경스트레스 요인에 대하여 현저하게 증가된 저항성을 갖게 된다. 이러한 biofilm은 해양생태계, 산업 환경, 인체 등 미생물이 존재하는 지구상에 대부분에 만들어지면서, 미생물의 생육, 외부 환경에 대한 방어, 병원성 등의 기능을 하고 있다. 특히, 대부분의 식품은 미생물이 존재할 수 있기 때문에 biofilm을 형성한 상태로 있을 가능성이 높다. 이에 따라 최근 연구자들이 식품, 의료 기구 등에서 biofilm 형성 *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 제어를 위해 박테리오파지를 적용하여 효과를 확인하였다. Jassim et al. (2012)은 박테리오파지 처리를 통해 biofilm 형성 *E. coli*를 약 3 log 이하로 감소하는 효과를 확인하였으며, Lee & Park (2015)과 Sharma et al. (2005)은 stainless coupon에서 biofilm 형성 *E. coli* O157:H7을 박테리오파지 처리를 통해 제어 효과가 있는 것으로 보고

하였다. 또한, Carson et al. (2010)과 Liao et al. (2012)은 카테터에 박테리오파지를 처리하여 biofilm 형성을 방지할 수 있는 것으로 나타났다. 그러므로, 본 연구에서 분리된 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 이용해 biofilm 형성 *Cronobacter* spp.의 제어하는 데 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서 김치와 오수로부터 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 각각 분리하였으며, 숙주 저해 범위는 기 분리된 *C. sakazakii*에 대해 KCES2 파지는 약 26.3%와 ESP 2949-2 파지는 19.3%로 확인되었다. 또한, 형태학적 특성을 확인한 결과 모두 *Myoviridae* family에 속하는 것으로 나타났으며, 각각의 박테리오파지에 대해 열안정성은 70°C에서 30분 처리시에 모두 사멸되었다. 그리고, 분리된 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 접종한 결과 *C. sakazakii*의 생육 억제 효과가 있었다. 또한, biofilm 형성 *C. sakazakii*에 박테리오파지를 각각 처리했을 때 6시간, 12시간 이후에 모두 저감화 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 연구를 통해 분리된 KCES2 파지와 ESP 2949-2 파지를 *C. sakazakii*와 biofilm 형성 *C. sakazakii*의 생물학적 제어제로 적용이 가능할 것으로 사료된다.

References

- Abbasifar R, Kropinski AM, Sabour PM, Chambers JR, MacKinnon J, Malig T, Griffiths MW. 2014. Efficiency of bacteriophage therapy against *Cronobacter sakazakii* in *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae. Arch. Virol. 159: 2253-2261.
- Ackermann HW. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res. Microbiol. 154: 245-251.

- Adamson DH, Rogers JR. 1981. *Enterobacter sakazakii* meningitis with sepsis. Clin. Microbiol. Newsl. 3: 19-20.
- Barron JC, Forsythe SJ. 2007. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot. 70: 2111-2117.
- Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol. 95: 967-973.
- Clark JR, March JB. 2006. Bacteriophages and biotechnology. Trends Biotechnol. 24: 212-218.
- Brussow A, Kutter E. 2005. Phage Ecology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Buzrul S, Öztürk, P, Alpas H, Akcelik M. 2007. Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. LWT-Food Sci. Technol. 40: 1671-1677.
- Carson L, Gorman SP, Gilmore BF. 2010. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 59: 447-455.
- Coffey B, Rivas L, Duffy G, Coffey A, Ross RP, McAuliffe O. 2011. Assessment of *Escherichia coli* O157:H7-specific bacteriophages e11/2 and e4/1c in model broth and hide environments. Int. J. Food Microbiol. 147: 188-194.
- Cottyn B, Regalaco E, Lanoot B, De Clenne M, Mew TW, Swings J. 2001. Bacterial population associated with rice seed in the tropical environment. Phytopathol. 91: 282-292.
- Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL. 2005. Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot. 68: 1900-1902.
- Farber JM, Forsythe SJ. 2008. *Enterobacter sakazakii*. ASM Press Inc., Washington, USA.
- Guglielmotti DM, Mercanti DJ, Reinheimer JA, Quiberoni Adel L. 2011. Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. Front. Microbiol. 2: 282.
- Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. Int. J. Food Microbiol. 104: 1-34.
- Gurtler JB, Beuchat LR. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. J. Food Prot. 70: 1579-1586.
- Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, Stephan R, Joosten H. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1442-1447.
- Jassim SA, Abdulmir AS, Abu Bakar F. 2012. Novel phage-based bio-processing of pathogenic *Escherichia coli* and its biofilms. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 47-60.
- Jung MK, Park JH. 2006. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. Food Sci. Biotechnol. 15: 152-157.
- Lee YD, Ryu TW, Chang HI, Park JH. 2010. Identification and classification of *Cronobacter* spp. isolated from powdered food in Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 20: 757-762.
- Lee YD, Park JH. 2011. Virulent bacteriophage for growth inhibition of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* typhimurium. Korean J. Food Sci. Technol. 43: 176-181.
- Lee YD, Park JH, Chang HI. 2012. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. Food Control 24: 225-230.
- Lee YD, Park JH. 2015. Characterization and application of phages isolated from sewage for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm. LWT-Food Sci. Technol. 60: 571-577.
- Lehner A, Stephan R. 2004. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. J. Food Prot. 67: 2850-2857.
- Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R. 2005. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspect promoting environmental persistence. J. Food Prot. 68: 2287-2294.
- Li S, Liu L, Zhu J, Zou L, Li M, Cong, Y, Rao X, Hu X, Zhou Y, Chen Z, Hu F. 2010. Characterization and genome sequencing of a novel coliphage isolated from engineered *Escherichia coli*. Intervirology. 53: 211-220.
- Liao KS, Lehman SM, Tweardy DJ, Donlan RM, Trautner BW. 2012. Bacteriophages are synergistic with bacterial interference for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. J. Appl. Microbiol. 113: 1530-1539.
- Mahaff WF, Klopper JW. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.) Microbiol. Ecol. 34: 210-223.
- Muytjens HL, Roelofs-Willems H, Jaspars GH, 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 26: 743-746.
- O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54: 49-79.
- Sambrook, J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
- Sharma M, Ryu JH, Beuchat LR. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. J. Appl. Microbiol. 99: 449-459.
- Soriano JM, Rico H, Molto JC, Manes J. 2001. Incidence of microbial flora in lettuce meat and Spanish potato omelette from restaurant. Food Microbiol. 18:159-163.
- Urmenyi AMC, Franklin AW. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. Lancet 1: 313-315.