pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 4, pp. 349~353 (2013)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2013.28.4.349

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

훈증소독제, Fumagari OPP®의 *Staphylococcus aureus*에 대한 살균효과

차춘남[1] · 박은기[2] · 최현주[3] · 김용팔[4] · 유창열[5] · 김석 · 이후장*

경상대학교 수의과대학 생명과학연구원, [1]경상대학교 산업시스템공학부 공학연구원,
[2]고신대학교 의과대학 인문사회의학교실, [3]인제대학교 임상병리학과,
[4]엘캄코바이오(주), [5]경남도립남해대학 인터넷정보학과

Bactericidal Efficacy of Fumagari OPP®, Fumigant Against *Staphylococcus aureus*

Chun-Nam Cha[1], Eun-Kee Park[2], Hyunju Choi[3], Yongpal Kim[4], Chang-Yeol Yoo[5], Suk Kim, and Hu-Jang Lee*

Research Institute of Life Sciences, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 600-701, Korea
[1]Engineering Research Institute and Department of Industrial Systems Engineering, Gyeongsang National University, Chinju, Korea
[2]Department of Medical Humanities and Social Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan, Korea
[3]Elderly Life Redesign Institute and Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae, Korea
[4]Elkahmco Bio Co., Ltd., Seoul 143-802, Korea
[5]Department of Computer Information, Gyeongnam Provincial Namhae College, Namhae 668-801, Korea
(Received September 16, 2013/Revised October 7, 2013/Accepted November 5, 2013)

ABSTRACT - This study was performed to evaluate the bactericidal efficacy of Fumagari OPP®, fumigation disinfectant, containing 20% ortho-phenylphenol against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). In this research, efficacy test of fumigant against *S. aureus* was carried out according to French standard NF T 72-281. *S. aureus* working culture suspension number (N value), all of the colony numbers on the carriers exposed with the fumigant (n1, n2, and n3), the number of bacterial test suspentions by pour plate method (N1), the number of bacterial test suspentions by filter membrane method (N2) and the mean number of bacteria recovered on the control-carriers (T value) were obtained from the preliminary test. In addition, the reduction number of *S. aureus* exposed with the fumigant (d value) was calculated using T value, the mean number of bacteria in recovery solution (n'1) and the mean number of bacteria on carriers plated in agar (n'2). N value was 4.0×10^8 CFU/mL, and n1, n2, and n3 were higher than 0.5N1, 0.5N2 and 0.5N1, respectively. Additionally, T value was 3.4×10^6 CFU/mL. In the bactericidal effect of the fumigant, the d value was 6.43 logCFU/mL. According to the French standard for the fumigant, the d value for the effective bactericidal fumigant should be over than 5 logCFU/mL. The results indicated that Fumagari OPP® had an effective bactericidal activity against *S. aureus*, then the fumigant can be applied to disinfect food materials and kitchen appliances contaminated with pathogenic bacteria.

Key words: fumigant, disinfectant, ortho-phenylphenol, *S. aureus*

황색포도상구균은 화농성질환 및 식중독의 원인균으로서 식품위생상 중요한 세균이다. 황색포도상구균은 저항성이 강하여 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있으며, 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있어서 식품에 쉽게 오염되어 식중독을 유발시키는 것으로 알려져 있다[1].

과거의 식중독 발생은 고기류와 생선 등 단백질이 풍부한 식품에 의한 식중독이 대부분을 차지하고 있었으나, 최근에는 과일과 채소 등에서 비롯된 식중독 사례가 증가하고 있으며, 신선과채류를 통해 발생하는 식중독의 대부분은 주변 환경으로부터 오염된 식품을 섭취하여 발생하는 것으로 보고되고 있다[2,3].

식품의약품안전처 식중독통계시스템에 의하면[4], 2002년

*Correspondence to: Hu-Jang Lee, Research Institute of Life Sciences, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 600-701, Korea
Tel: 82-55-772-2352, Fax: 82-55-772-2308
E-mail: hujang@gnu.ac.kr

부터 2012년까지 우리나라에서 발생한 식중독의 원인으로 세균성이 가장 많았으며, 이 중에서도 병원성대장균과 황색포도상구균에 의한 환자 발생비율이 가장 높았던 것으로 나타났다.

황색포도상구균은 항생제에 대한 내성으로 인해 일반적인 항생제로는 제어하기가 점점 어려워지고 있으며, 메치실린 내성 황색포도상구균의 경우, 클로르헥시딘, 4급 암모늄 화합물, 염화벤잘코늄 등과 같은 소독제에 대한 감수성이 감소하고 있다고 보고되고 있다[5].

식품공장, 병원, 가정, 가축농장 등에서 살균제의 사용이 증가함에 따라, 항생제 내성균 출현기전과 동일하게, 살균제 내성균의 출현이 증가하고 있는 것에 대해 공중보건학적 관심이 높아지고 있다[6]. 따라서 살균제는 주로 세균의 대사기전에 광범위하게 작용하는 성분들의 혼합으로 조성되고 있으며, 이러한 조성물들은 살균제에 대한 세균의 내성형성을 어렵게 만드는 것으로 알려져 있다[7].

전 세계적으로, 포스핀 가스, 오존 가스, 인화수소, ortho-phenylphenol (OPP) 등과 같은 많은 훈증소독제는 식품저장소나 위생관련 시설의 소독을 위해, 광범위하게 사용되고 있다[8-10]. 특히, OPP는 식품공장, 가정, 병원 등에서 기구나 표면재의 소독을 위해 사용되고 있다[8].

현재까지, 식중독 관련 병원성 세균에 대한 OPP를 주성분으로 하는 훈증소독제의 효능에 관한 연구는 매우 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 Association Francaise de Normalisation (AFNOR)[11]의 '훈증소독제의 살균, 살곰팡이, 살효모, 그리고 살아포 효력을 결정하기 위한 기준법'에 따라, 식중독 관련 주요 세균인 황색포도상구균에 대한 OPP를 주성분으로 하는 훈증소독제의 살균효과를 확인하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

실험물질

본 시험에 사용된 실험물질은 엘캄코바이오 (서울)에서 공급받은 OPP를 주성분으로 하는 훈증소독제, Fumagari OPP® (1 캔 (20 g), OPP 4 g)를 사용하였다. 실험물질은 흰색의 분말로서 사용기간 동안 실온에 보관하여 실험에 사용하였다.

균주 배양

Staphylococcus aureus (*S. aureus*, KCTC 1916)는 한국생명공학연구원 생명자원센터 (대전)에서 분양받아 실험에 사용하였다.

*S. aureus*를 각각 고압 멸균된 tryptone soy broth (TSB, Difco, Detroit, MI)에 심어 37°C에서 24시간 동안 계대배양한 후, McFaland 등의 방법[12]에 따라 배양액의 탁도를 측정하고, 희석액 (증류수 1 L 중, tryptone 1.0 g, sodium chloride 8.5 g)을 사용하여, *S. aureus*의 농도가 10^9 CFU/mL 이상이 되도록 조정하였다. 이어서, 환원유 (증류수 1 L 중, 탈지분유 100 g)를 가하여 20배로 희석하여, 10^8-10^9 CFU/mL로 조정하여 시험에 사용하였다.

환원유 혼합 현탁액의 균수계산

환원유 혼합 *S. aureus* 현탁액을 각각 희석액으로 10^7과 10^8 배로 희석한 다음, 각각의 희석액 1 mL를 취하여 페트리접시에 넣고, *S. aureus* 희석액이 들어 있는 페트리접시에 45°C의 TSA배지 20 mL을 넣었다. 또한, 10^7과 10^8 배로 희석한 균주 현탁액 1 mL를 각각 취하여 분리 막 여과장치에 넣고 여과한 후, 세척액으로 씻어준 다음, 각각의 여과막을 TSA배지 위에 올려놓고, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 균수 계산이 불가능한 배지는 폐기하고, 다시 24시간 동안 더 배양한 후, 균수를 계산하였다. 평판배지법[13]과 여과법[14]으로 배양한 균수를 각각 N1과 N2로 하였다.

균주의 담체 도포 및 소독제 적용

S. aureus 현탁액 0.05 mL을 각각 5개의 비다공성의 스테인리스 담체 (지름 3 cm, 높이 1.2 mm)에 도포하고, 도포된 담체들을 멸균 페트리접시에 담아, 37°C 배양기에서 건조시켰다. 이때, 건조시간은 45분을 초과하지 않도록 하였다. 온도 21 ± 0.5°C, 습도 60 ± 10% 조건의 밀폐된 방 (25 m^3)에 건조된 담체 2개를 페트리 접시에 담아, 훈증소독제 노출 없이 15시간 동안 놓아두었다. 나머지 3개의 건조된 담체는 2개의 건조된 담체와 동일한 환경에서, 훈증소독제와 담체를 담은 페트리 접시와의 거리 2.2 m, 바닥으로부터 높이 1.2 m 위치에 페트리 접시를 수직으로 세워 훈증소독제와 반대 방향이 되도록 한 다음, 훈증소독제에 불을 붙여 15시간 동안 노출시켰다.

소독제 잔류효과

Fig. 1은 훈증소독제 잔류에 의한 균 증식 억제 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하는 과정을 나타낸 것이다.

*S. aureus*를 도포・건조시킨 담체를 훈증소독제에 15시간 노출시킨 직후, 각각의 담체를 100 mL 회복액 (증류수 1 L 중, tryptone 1.0 g, NaCl 8.5 g)이 들어있는 삼각플라스크에 넣고, 수초 동안 흔들어 준 다음, 1 mL을 취하여 페트리접시에 넣고, 균주 희석액 (10^7과 10^8 배) 1 mL를 섞이지 않게 넣은 다음, 배양배지에서 잘 혼합한 후, 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 자란 집락수의 평균값을 n1로 하였다. 담체를 넣은 회복액 98 mL를 막 여과하고, 50 mL 희석액으로 3번 세정한 후, 희석액에 4번 침지시킨 여과막을 배지에 넣고, 희석한 시험 균주 현탁액 (10^7과 10^8 배) 1 mL을 가하여, 혼합하여 배양한 다음, 형성된 집락수의 평균값을 n2로 하였다. 희석한 시험 균주 현

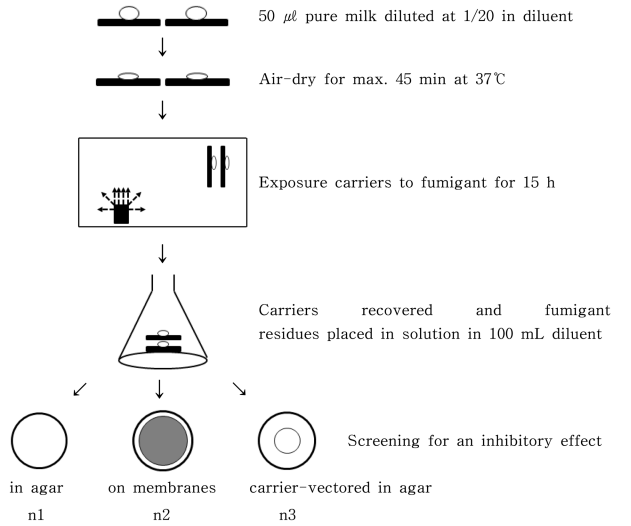

Fig. 1. Schematic diagram of the preliminary screening test for an inhibitory effect of fumigant residues.

탁액 (10^7과 10^8 배) 1 mL과, 회복액에서 잔류물이 제거된 담체를 넣은 회복액 1 mL을 페트리접시에 넣고, 배지를 가하여 혼합하여 배양한 후, 자란 집락수의 평균값을 n3으로 하였다. 이렇게 얻은 n1, n2, n3를 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1과 비교하였다.

훈증소독제 적용

*S. aureus*를 도포・건조시킨 담체를 훈증소독제에 15시간 노출시킨 직후, 각각의 담체를 100 mL 회복액이 있는 삼각플라스크에 넣고, 수초 동안 흔들어 준 다음, 유리봉을 이용하여, 담체에 부착된 잔류물을 제거하고, 1분 동안 초음파 진동기를 이용하여 남은 잔류물을 제거하였다. 이어서, 담체 잔류물이 들어 있는 회복액으로 부터 1 mL을 취하여 9 mL 새로운 회복액에 넣고, 연속적으로 두 번 더 희석시켜 10^3 배로 희석하였다. 담체 잔류물이 들어 있는 회복액과, 10^2와 10^3 배 희석액을 각각 1 mL을 취하여 배양배지가 들어 있는 평판배지에 접종하여, 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음, 각각의 집락수를 계산하였다. 담체로부터 부착된 잔류물을 제거한 회복액 현탁액 87 mL을 분리 막 여과장치에 넣고 여과한 후, 여과막을 영양배지 위에 올려놓고 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음, 각각의 집락수의 평균값을 n'1로 하였다. 잔류물을 제거한 담체를 넣은 회복액 현탁액을 배지에 넣고 배양하여, 자란 집락수의 평균을 n'2로 하였다.

실험 결과의 계산

14이하 300 이상인 배지의 집락수는 세지 않았으며, 시험균주 현탁액 중 균수 (N), 대조 담체의 회복 균수 (T), 그리고 훈증소독제 노출 담체의 균수 감소 log값 (d)의 계산은 아래 각각의 식에 의해 산출하였다.

$$N\ (CFU/mL) = \frac{x+y+z+w}{2.2} \times 10^7$$

(10^7 배로 희석하여 얻은 값: x, y; 10^8 배로 희석하여 얻은 값: z, w)

$$T\ (CFU/carrier) = \frac{x+y+z+w}{2.2} \times 10^2 \times 100$$

(10^2 배 회복액에서 얻은 값: x, y; 10^3 배 회복액에서 얻은 값: z, w)

$$d\ (logCFU/mL) = logT - log(n'1 + n'2) = log[T/(n'1 + n'2)]$$

(n'1: 담체 부착물 함유 회복액 여과막에서 자란 균주 집락수의 평균, n'2: 담체 부착물 함유 회복액을 심은 배지에서 자란 균주 집락수의 평균)

훈증소독제 살균효과 판정

AFNOR[11]의 기준에 따라, *S. aureus*에 대한 훈증소독제의 효과는 '실험결과의 계산'에 의해 얻은 d값이 5 logCFU/mL 이상인 경우로 하였다.

결과 및 고찰

소독제 잔류효과

Table 1은 환원유 혼합 *S. aureus* 현탁액의 균수와, *S. aureus*를 도포・건조시킨 담체에 소독제를 노출시킨 후, 산출한 균수를 나타낸 것이다.

*S. aureus*로부터 구한 N값은 1.1×10^9 CFU/mL이었으며, T값은 2.7×10^6 CFU/mL이었다. 또한, 소독제 노출 담체로부터 증식한 균수 n1, n2, n3값이 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1값 보다 모두 크게 나타났다.

AFNOR[11]에 따르면, 실험균주 현탁액 배양 균수로부터 산출된 N값은 10^8에서 5×10^9 사이에 있어야 하며, 소독제에 노출되지 않은 대조군-담체로부터 배양된 균수로부터 산출된 T값은 10^6 CFU/mL이상이어야 한다고 규정하고 있다. 따라서 본 연구에서, *S. aureus*로부터 구한 N값과 T값은 모두 AFNOR[11]에서 규정한 기준을 만족하여, 본 훈증소독제 효력시험에 의한 결과는 유효성 있는 것으로 사료된다.

또한, AFNOR[11]에 따르면, 소독제 노출 담체로부터 증식한 균수, n1, n2, n3값은 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1값 보다 모두 커야 훈증소독제 실험을 수행할 수 있는 전제조건을 만족하는 것으로 규정하고 있다. 만일, n1, n2, n3값이 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1값과 같거나 작으면, 배지나 여과막에 균의 증식을 충분히 억제 할 수 있는 많은 양의 소독제가 잔류하고 있다는 것을 의미하므로, 배지의 조성을 조정하거나, 담체 회복액에 중화제를 첨가하거나, 여과막의 세정 횟수를 증가시켜 실험을 다시 수행하여 조건을 만족시켜야 하는 것으로 규정하고 있다.

Table 1. Viable counts (CFU/mL) of *Staphylococcus aureus* in milk-to-suspensions and in the carriers exposed to the fumigant

Milk-to-suspensions									Exposure to disinfectant							
N1[1]				N2[2]				N value[3]	Exposure-carriers[4]				Control-carriers			T value[6]
10^7		10^8		10^7		10^8			No.	n1	n2	n3	DT[5]	1	2	
76	72	57	53	70	66	52	50	1.1×10^9	1	53	59	54	10^2	233	279	2.7×10^6
									2	55	61	58				
									3	54	60	56	10^3	38	43	
74		55		68		51				54	60	56				

[1]N1, the number of bacterial test suspentions by pour plate method.
[2]N2, the number of bacterial test suspentions by filter membrane method.
[3]N, the number of bacteria of working culture suspension.

$$N = \frac{(x+y+z+w)}{2.2} \times 10^7$$ (x, y: 10^7 dilution colony; z, w: 10^8 dilution colony)

[4]n1, n2, n3, the colony numbers on the carriers exposed the fumigant.
[5]DT, dilution time.
[6]T, the mean number of bacteria recovered on the control-carriers.

$$T = \frac{(x+y+z+w)}{2.2} \times 10^2 \times 100$$ (x, y: 10^2 dilution colony; z, w: 10^3 dilution colony)

훈증소독제의 살균효과

Table 2는 훈증소독제를 노출시킨 담체로부터 회복된 균수와 훈증소독제의 살균효과를 나타낸 것이다.

S. aureus 도포 담체에 소독제를 노출시킨 후, 배양을 통해 확인된 균수의 logCFU/mL 감소값, 즉, d 값은 6.43 logCFU/mL로 나타나, OPP를 주성분으로 하는 훈증소독제, Fumagari OPP®는 AFNOR[11]의 기준인 5 logCFU/mL 이상을 만족하여, *S. aureus*에 대해 높은 살균효과를 갖는 것으로 나타났다.

Morino 등[15]은 낮은 농도의 이산화염소 가스 (0.05 ppm, 0.14 mg/m^3)를 이용하여 여러 병원성 세균에 대한 살균효과를 확인하였는바, 젖은 상태의 담체에 이산화염소 가스를 5시간 노출시킨 결과, *S. aureus*가 2 logCFU 이상 감소하였다고 보고하였다. Zoutman 등[16]은 여러 병원성 세균을 각각의 스테인리스 담체에 도포・건조시킨 담체에 오존 80 ppm에 1% 과산화수소 증기를 혼합하여 90분 동안 훈증시킨 결과, 메치실린 내성 *S. aureus*가 6.43 log CFU 감소하였다고 보고하였다. 또한, Mohammad와 Khodaparast[17]은 과일에 오존가스를 5 ppm으로 하여 45분 동안 노출시킨 결과, *S. aureus*는 노출 전 농도가 3.52 logCFU/g이었으나, 노출 후에는 0.41 logCFU/g로 감소하였다고 보고하였다.

Table 2. Viable counts (CFU/mL) of *Staphylococcus aureus* in the carriers exposed to disinfectant and antibacterial effect of the fumigant

Dilution time	Colony number in carriers[1]			n'1[2]	n'2[3]	d value (log)[4]
	C1	C2	C3			
10^2	0	0	0	0	0	
				0	0	5.43
10^3	0	0	0	0	0	

[1]C1, C2, C3, test-carriers.
[2]n'1, the mean number of bacteria in recovery solution.
[3]n'2, the mean number of bacteria on carriers plated in agar.
[4]d, the reduction of bacterial number.
$d = \log T - \log(n'1 + n'2) = \log[T/(n'1 + n'2)]$
(T, the mean number of bacteria recovered on the carriers)

처리대상, 처리 농도, 그리고 처리시간 등을 고려할 경우, 본 연구에서 사용한 Fumagari OPP®의 *S. aureus*에 대한 살균효과는 Morino 등[15]의 연구결과보다는 높았으나, Zoutman 등[16]과 Mohammad와 Khodaparast[17]의 연구결과보다는 낮았던 것으로 사료된다.

본 연구결과로부터, OPP를 주성분으로 하는 훈증 소독제, Fumagari OPP®는 비다공성의 표면에 부착되어 있는 *S. aureus*를 6.43 logCFU 이상 감소시켜, 오염된 표면의 *S. aureus*에 대해 효과적으로 살균할 수 있는 훈증살균 소독제로 사료된다.

본 연구를 통해, OPP를 주성분으로 하는 훈증 소독제의 *S. aureus*에 대한 살균효과를 처음으로 실험실 수준에서 규명하였으며, 향후, *S. aureus*에 오염된 식품저장소나 환경 중에서 OPP를 주성분으로 하는 훈증 소독제의 적응시험을 통해 그 효과를 규명할 필요가 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 20% ortho-phenylphenol을 함유한 훈증소독제, Fumagari OPP®의 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)에 대한 살균효과를 평가하기 위해, French standard NF T 72-281에 따라 수행하였다. 배양 현탁액 중 *S. aureus*의 균수 (N 값), 훈증소독제에 노출된 각 담체의 균수 (n1, n2, n3), 평판배지법에 의한 시험균주 현탁액 중 균수 (N1), 여

과법에 의한 시험균주 현탁액 중 균수 (N2), 그리고 대조 담체의 회복 균수의 평균값 (T 값)을 예비실험을 통해 구하였다.

또한, 훈증소독제에 노출된 *S. aureus*의 감소 균수 (d 값)는, T 값, 회복액 중 균수의 평균값 (n'1) 그리고 배지의 담체에서 증식한 균수의 평균값 (n'2) 등을 이용하여 산출하였다. N 값은 4.0×10^8 CFU/mL이었으며, n1, n2, n3은 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1 보다 높게 나타났다. 그리고 T 값은 3.4×10^6 CFU/mL이었다. 훈증소독제의 살균효과에 있어서, d 값은 6.43 logCFU/mL이었다. 훈증소독제에 대한 프랑스 기준에 따르면, 효과적인 살균력을 갖는 훈증소독제의 d 값이 5 logCFU/mL 이상이어야 하는 것으로 규정하고 있다. 본 연구의 결과로부터, Fumagari OPP®는 *S. aureus*에 대해 높은 살균효과를 갖는 것으로 나타나, 병원성 세균으로 오염된 식품재료와 주방기기의 소독에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 (주)엘캄코바이오 (서울)의 연구용역으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kang, Y., Yoon, S., Jwa, S., Lee, D., Woo, G.J., Park, Y. and Kim, C.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* in Kimbap. *J. Fd. Hyg. Safety*, **17**, 31-35 (2002).
2. Kim, S.R., Lee, S.H., Seo, M.K., Kim, W.I., Park, K.H., Yun, H.J., Yoon, Y., Yoo, S.Y., Ryu, K.Y., Yun, J.C. and Kim, B.S.: Evaluation of selective media for isolation of *Staphylococcus aureus* from agricultural products. *J. Fd. Hyg. Safety*, **27**, 169-175 (2012).
3. Patel, J. and Sharma, M.: Differences in attachement of *Salmonella enteric* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol*., **139**, 41-47 (2010).
4. Foodborne disease Statistics System, Ministry of Food and Drug Safety.: Statistical data for the outbreak of food poisoning by bacteria. Available from http://www.mfds.go.kr/e-stat/index.do?nMenuCode=5. Accessed 22 July 2013.
5. Wootton, M., Walsh, T.R., Davies, E.M. and Howe, R.A.: Evaluation of the effectiveness of common hospital hand disinfectants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, glycopeptide-intermediate *S. aureus*, and heterogeneous glycopeptide-intermediate *S. aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*., **30(3)**, 226-232 (2009).
6. Russell, A.D.: Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect. Dis*., **3**, 794-803 (2003).
7. Sheldon, A.T.: Antiseptic "resistance": real or perceived threat? *Clin. Infect. Dis*., **40**, 1650-1656 (2005).
8. Coelhan, M., Bromig, K.H., Glas, K. and Roberts, A.L.: Determination and levels of the biocide ortho-Phenylphenol in canned beers from different countries. *J. Agric. Food Chem*., **54**, 5731-5735 (2006).
9. Zoutman, D., Shannon, M. and Mandel, A.: Effectiveness of a novel ozone-based system for the rapid high-level disinfection of health care spaces and surfaces. *Am. J. Infect. Control*, **39(10)**, 873-879 (2011).
10. Formato, A., Naviglio, D., Pucillo, G.P. and Nota, G.: Improved fumigation process for stored foodstuffs by using phosphine in sealed chambers. *J. Agric. Food Chem*., **60**, 331-338 (2012).
11. Association Francaise de Normalisation (AFNOR): Methods of airborne disinfection of surfaces - Determination of bactericidal, fungicidal, yeasticidal and sporicidal activity. French standard NF T 72-281, AFNOR, Saint-Denis, pp. 6-22 (2009).
12. Mills-Robertson, F.C., Tay, S.C.K., Duker-Eshun, G., Walana, W. and Badu, K.: *In vitro* antimicrobial activity of ethanolic fractions of Cryptolepis sanguinolenta. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*., **11**, 16 (2012).
13. Brashears, M.M., Amezquita, A. and Stratton, J.: Validation of methods used to recover *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. subjected to stress conditionst. *J. Food Prot*., **4**, 1466-1471 (2001).
14. Tanny, G.B., Mirelman, D. and Pistole, T.: Improved filtration technique for concentrating and harvesting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*., **40**, 269-273 (1980).
15. Morino, H., Fukuda, T., Miura, T. and Shibata, T.: Effect of low-concentration chlorine dioxide gas against bacteria and viruses on a glass surface in wet environments. *Lett. Appl. Microbiol*., **53**, 628-634 (2011).
16. Zoutman, D., Shannon, M. and Mandel, A.: Effectiveness of a novel ozone-based system for the rapid high-level disinfection of health care spaces and surfaces. *Am. J. Infect. Control*, **39(10)**, 873-879 (2011).
17. Mohammad, B.H.N. and Khodaparast, M.H.H.: Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control*, **20**, 27-30 (2009).