pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 3, pp. 217~222 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.3.217

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

Ortho-phenylphenol을 주성분을 하는 훈증소독제의 *Clostridium perfringens* 아포에 대한 살아포 효과

차춘남[1] · 조유영[2] · 이후장*

경상대학교 수의과대학 생명과학연구원, [1]경상대학교 산업시스템공학부 공학연구원, [2]한영대학 간호학과

Sporicidal Efficacy of a Fumigation Disinfectant Composited to Ortho-phenylphenol Against Spores of *Clostridium Perfringens*

Chun-Nam Cha[1], Youyoung Cho[2], 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 Nursing, Hanyeong College, Yeosu 550-704, Korea

(Received May 13, 2014/Revised June 18, 2014/Accepted September 1, 2014)

ABSTRACT - This study was performed to evaluate the sporicidal efficacy of a fumigation disinfectant containing 20% ortho-phenylphenol against *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) spores. In this research, efficacy test of fumigant against *C. perfringens* spores was carried out according to French standard NF T 72-281. *C. perfringens* spores working culture suspension number (N value), all the spore numbers on the carriers exposed with the fumigant (n1, n2, and n3), the number of bacterial spore suspensions by pour plate method (N1), the number of bacterial spore suspensions by filter membrane method (N2) and the mean number of bacterial spore recovered on the control-carriers (T value) were obtained from the preliminary test. In addition, the reduction number of *C. perfringens* spores exposed with the fumigant (d value) was calculated using T value, the mean number of bacterial spore in recovery solution (n'1) and the mean number of bacterial spore on carriers plated in agar (n'2). N value was 4.3×10^7 spores/mL, and n1, n2, and n3 were higher than 0.5N1, 0.5N2 and 0.5N1, respectively. Additionally, T value was 4.9×10^5 spores/carrier. In the sporicidal effect of the fumigant, the d value was 4.52log reduction. According to the French standard for the fumigant, the d value for the effective sporicidal fumigant should be over than 3log reduction. The results indicated that Fumagari OPP® had an efficient sporicidal activity against spores of *C. perfringens*, then the fumigant can be applied to disinfect food materials and kitchen appliances contaminated with bacterial spores.

Key words : fumigant, sporicidal efficacy, ortho-phenylphenol, *C. perfringens*

Clostridium perfringens (*C. perfringens*)는 그람양성의 혐기성 간균으로 아포를 형성하며, 토양과 동물의 위장관에 광범위하게 분포하고 있다[1]. 또한, 강력한 exotoxin들을 생산하는 능력을 갖고 있어서, 가축과 사람에서 조직 독성과 위장관 질병의 중요한 원인으로 작용하고 있다[2].

*C. perfringens*는, 사람에서 발생하는 식중독에서 가장 빈번하게 분리되는 병원균 중의 하나이다[3]. 전 세계적으로, *C. perfringens*는 식중독의 가장 일반적인 원인들 중 세 번째로 많은 것으로 보고되어 있으며[4], 선진국에서는 매년 식중독의 가장 일반적인 원인으로 나타나고 있다[5].

우리나라 식중독통계시스템에 따르면[6], 2012년 세균성 식중독 중 *C. perfringens*는 병원성대장균에 이어 두 번째로 많이 발생한 원인균으로 나타났다. 또한, *C. perfringens*는 영국과 미국에서도 세 번째로 가장 일반적인 식중독의 원인으로 보고되어 있다[4].

식육과 식료품에서 *C. perfringens*가 일반적으로 검출되는 이유는 도축과정에서 가축의 장 내용물이 식육과 도체를 오염시키기 때문인 것으로 추정되고 있다[7]. 내독소 양성 *C. perfringens* type A가 생성하는 내독소가 식중독과 비식중독성 장관 질환의 발병에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 역학조사를 통해 밝혀지고 있다[8]. 특히, *C.*

*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

*perfringens*의 내독소에 의해 유발된 장관질환을 갖고 있는 환자의 분변에는 동물모델에서 장관질환을 일으킬 수 있을 정도의 내독소를 함유하고 있는 것으로 보고되었다[9].

식품산업에서, 식육가공과정에서 적용되는 열처리는 전형적으로 *C. perfringens*를 사멸시키기에 충분하지만, *C. perfringens*의 아포는 생존하여 위험수준까지 증식하게 된다[10,11].

가축의 성장·증체와 질병의 예방을 목적으로 광범위한 항생제 사용은 장내에 서식하고 있는 정상적인 균들에서의 항생제 내성의 출현과 중요하게 관련되어 있는 것으로 추정되고 있다[12]. 몇몇 나라에서, 가축으로부터 분리된 *C. perfringens*가 바시트라신, 테트라싸이클린, 클린다마이신, 린코마이신 그리고 에리스로마이신 등에 대해 내성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다[13,14].

항생제의 오·남용으로 인해, *C. perfringens*의 내성 균주들이 증가함에 따라, *C. perfringens*에 의한 감염과 질병 방생을 예방하기 위한 효과적인 소독제를 필요로 하고 있다[15]. 모든 소독제들이 *C. perfringens*를 포함한 주요한 병원체에 대해 효과적인 것은 아니므로, 소독제의 선택은 성공적인 방역 프로그램을 설정하는데 있어서 매우 중요하다. 소독제들은 대부분 병원균에 대해 광범위한 효과를 갖는 성분들의 혼합으로 조성되어 있는데, 이는 병원체들이 소독제들에 대해 내성을 형성하는 것을 어렵게 만든다[16].

이산화염소, 염산 베타인 그리고 프로필렌 글리콜 (propylene glycol) 등이 가축농장의 소독과 식중독의 예방을 목적으로 사용되고 있다[17-19]. 그러나 식품공장, 병원, 가정, 가축농장 등에서 살균제의 사용이 증가함에 따라, 항생제 내성균 출현기전과 동일하게, 살균제 내성균의 출현이 증가하고 있는 것에 대해 공중보건학적 관심이 높아지고 있다[20].

전 세계적으로, 포스핀 가스, 오존 가스, 인화수소, ortho-phenylphenol (OPP) 등과 같은 많은 훈증소독제는 식품저장소나 위생관련 시설의 소독을 위해, 광범위하게 사용되고 있다[21-23]. 특히, OPP는 식품공장, 가정, 병원 등에서 기구나 표면재의 소독을 위해 사용되고 있다[21].

현재까지, 식중독 관련 *C. perfringens*에 대한 OPP를 주성분으로 하는 훈증소독제의 효능에 관한 연구는 매우 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 Association Francaise de Normalisation (AFNOR)[24]의 '훈증소독제의 살균, 살곰팡이, 살효모, 그리고 살아포 효력을 결정하기 위한 기준법'에 따라, *C. perfringens*에 대한 OPP를 주성분으로 하는 훈증소독제의 살균효과를 확인하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

실험물질

본 시험에 사용된 실험물질은 (주)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

C. perfringens (KVCC-BA1100001)는 한국수의유전자원은행 (안양)에서 분양받아 실험에 사용하였다.

*C. perfringens*를 고압 멸균된 Fluid Thioglycollate (FTG) 배지(BD Korea Co., Ltd., Incheon, Korea)에 심어 35°C, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 계대배양한 후, 배양액 0.4 mL을 새로운 10 mL FTG 배지로 옮겨, 37°C에서 8시간 동안 더 배양하였다. 배양된 배양액 0.4 mL을 10 mL sporulation medium(증류수 1 L 중, trypticase 20 g, L-arginine 2.5 g, lactose 1.0 g, yeast extract 2.0 g, proteose peptone 10 g, soluble starch 3 g, sodium thioglycolate 1 g, $Na_2HPO_4{\cdot}7H_2O$ 5 g)으로 옮겨, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 배양된 배양액에 멸균 냉수를 가하여 연속적으로 3반복으로 세정한 다음, 세정액 0.1 mL을 10 mL FTG 배지에 접종하고 75°C에서 20분간 가열한 후, 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액을 10 mL FTG 배지에 옮겨, 다시 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. Plate count agar (PCA)로 배양액 중 아포의 농도를 측정한 다음, 희석액을 사용하여 아포의 농도를 mL 당 2×10^7 이상이 되도록 희석한 후, 환원유 (증류수 1 L 중, 탈지분유 100 g)를 가하여 20배 희석하여, 아포가 mL당 2×10^7 개 이상인 것을 시험에 공시하였다.

환원유 혼합 현탁액의 아포수계산

조정된 *C. perfringens* 아포 현탁액을 희석액을 이용하여 10^5와 10^6 배로 희석한 다음, 각각의 희석액 1 mL을 취하여 페트리접시에 넣고, 45°C의 FTG 배지 15 mL을 넣었다. 10^5과 10^6 배로 희석한 현탁액 1 mL를 취하여 분리막 여과장치에 넣고 여과한 후, 세척액으로 씻어준 다음, 여과막을 FTG 배지 위에 올려놓았다. 각각의 배지를 30°C에서 72시간 동안 배양한 다음, 아포수 계산이 불가능한 배지는 폐기하고, 다시 24시간 동안 더 배양한 후, 아포수를 계산하였다. 주입평판법[25]과 여과법[26]으로 배양한 아포수를 각각 N1과 N2로 하였다.

균주의 담체 도포 및 소독제 적용

C. perfringens 아포 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 건조시키며, 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 훈증소독제에

노출이 없는 상태에서 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 훈증소독제에 의한 살균효과를 확인하기 위한 실험을 수행하는 과정을 나타낸 것이다.

C. perfrigens 아포를 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, 아포 희석액 (10^5과 10^6 배) 1 mL를 섞이지 않게 넣은 다음, 배양배지에서 잘 혼합한 후, 30°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 자란 아포수의 평균값을 n1로 하였다. 담체를 넣은 회복액 98 mL를 막 여과하고, 50 mL 희석액으로 3번 세정한 후, 희석액에 4번 침지시킨 여과막을 배지에 넣고, 희석한 시험 아포 현탁액 (10^5과 10^6 배) 1 mL을 가하여, 혼합하여 배양한 다음, 형성된 아포수의 평균값을 n2로 하였다. 희석한 시험 아포 현탁액 (10^5과 10^6 배) 1 mL과, 회복액에서 잔류물이 제거된 담체를 넣은 회복액 1 mL을 페트리접시에 넣고, 배지를 가하여 혼합하여 배양한 후, 자란 아포수의 평균값을 n3으로 하였다. 이렇게 얻은 n1, n2, n3를 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1과 비교하였다.

훈증소독제 적용 담체의 아포수계산

C. perfringens 아포를 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, 30°C에서 72시간 동안 배양한 다음, 각각의 아포수를 계산하였다. 담체로부터 부착된 잔류물을 제거한 회복액 현탁액 87 mL을 분리 막 여과장치에 넣고 여과한 후, 여과막을 영양배지 위에 올려놓고 30°C에서 72시간 동안 배양한 다음, 각각의 아포수의 평균값을 n'1로 하였다. 잔류물을 제거한 담체를 넣은 회복액 현탁액을 배지에 넣고 배양하여, 자란 아포수의 평균을 n'2로 하였다.

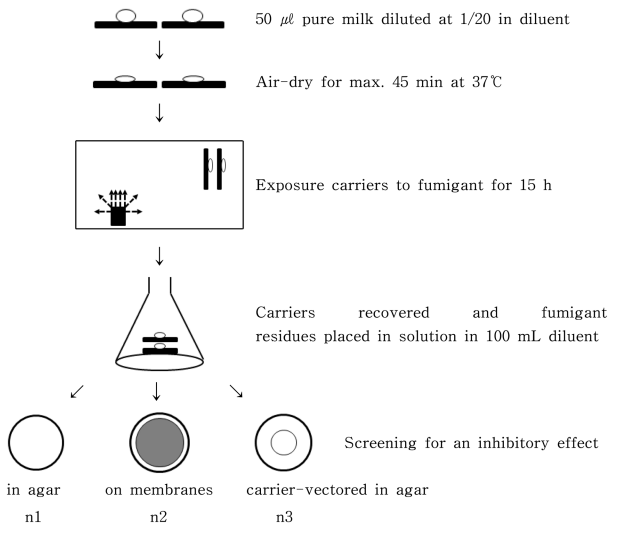

Fig. 1. Schematic diagram of the preliminary screening test for an inhibitory effect of fumigant residues.

실험 결과의 계산

14이하 300 이상인 배지의 아포수는 세지 않았으며, 시험 아포현탁액 중 아포수(N), 대조 담체의 회복 아포수(T), 그리고 훈증소독제 노출 담체의 아포 감소 log값 (d)의 계산은 아래 각각의 식에 의해 산출하였다.

$$N\ (\text{spores/mL}) = \frac{x+y+z+w}{2.2} \times 10^6$$

(10^5 배로 희석하여 얻은 값: x, y; 10^6배로 희석하여 얻은 값: z, w)

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

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

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

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

훈증소독제 살아포 효과 판정

AFNOR[24]의 기준에 따라, *C. perfringens* 아포에 대한 훈증소독제의 효과는 '실험결과의 계산'에 의해 얻은 d값이 3 이상인 경우로 하였다.

결과 및 고찰

소독제 잔류효과

Table 1은 환원유 혼합 *C. perfringens* 아포 현탁액의 아포수와, *C. perfringens* 아포 현탁액을 도포・건조시킨 담체에 소독제를 노출시킨 후, 산출한 아포수를 나타낸 것이다.

C. perfringens 아포 현탁액으로부터 구한 N값은 4.4×10^7 spores/mL이었으며, T값은 4.9×10^5 spores/carrier이었다. 또한, 소독제 노출 담체로부터 증식한 아포수 n1, n2, n3값이 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1값 보다 모두 크게 나타났다.

AFNOR[11]에 따르면, 실험 아포 현탁액 배양 아포수로부터 산출된 N값은 10^7에서 5×10^9 사이에 있어야 하며, 소독제에 노출되지 않은 대조군-담체로부터 배양된 아포수로부터 산출된 T값은 10^5 spores/carrier이상이어야 한다고 규정하고 있다. 따라서 본 연구에서, *C. perfringens* 아포로부터 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, n3값이 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 아포의 증식을 충분히 억제 할 수 있는 많은 양의 소독제가 잔류하고 있다는 것을 의미하므로, 배지의 조성을 조정하거나, 담체 회복액에 중화제를 첨가하거나, 혹은 여과막의 세정 횟수를 증가시켜 실험을 다시 수행하여 조건을 만족시켜야 하는 것으로 규정하고 있다.

훈증소독제의 살아포 효과

Table 2는 훈증소독제를 노출시킨 담체로부터 회복된 아포수와 훈증소독제의 살아포 효과를 나타낸 것이다.

C. perfringens 아포 현탁액 도포 담체에 소독제를 노출시킨 후, 배양을 통해 확인된 아포수의 감소값, 즉, d 값은 4.52로 나타나, OPP를 주성분으로 하는 훈증소독제, Fumagari OPP®는 AFNOR[11]의 기준인 3 이상을 만족하여, *C. perfringens* 아포에 대해 높은 살아포 효과를 갖는 것으로 나타났다.

Udompijitkul 등[27]은 스테인리스 스틸 표면에서 *C. perfringens* 아포에 대한 소독제의 살아포 효과를 시험한 결과, 요오드계 소독제 (요오드, 1.6% 함유)를 10분 동안 적용하여 2.7log 만큼 감소하는 결과를 나타내, 4급 암모늄이나 과산화수소를 주성분으로 하는 소독제들 보다 높은 살아포 효과를 냈다고 보고하였다. 또한, Speight 등[28]은 *Cllostridium difficile* 아포에 대한 32종 소독제의 살아포 효과를 시험한 결과, 이산화염소를 주성분으로 하는 소독제들만이 오염된 조건(3% albumin)에서 *Clostridium difficile* 아포에 1분 동안 적용하여 4log 이상의 살아포효

Table 2. Viable counts (spores/mL) of *Clostridium perfringens* spores in the carriers exposed to disinfectant and sporicidal 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	15	0	
				13	0	4.52
10^3	0	0	0	16	0	

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

Table 1. Viable counts (spores/mL) of *C. perfringens* spores 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]
10^5		10^6		10^5		10^6			No.	n1	n2	n3	DT[5]	1	2	
25	30	24	26	21	25	20	22	4.4×10^7	1	26	25	22	10^2	47	51	4.9×10^5
									2	20	23	18				
27.5		25		23		21			3	24	24	18	10^3	-	-	
										23.3	24	19.3				

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

$$N = \frac{x+y+z+w}{2.2} \times 10^6$$

(x, y: 10^5 dilution colony; z, w: 10^6 dilution colony)
[4]n1, n2, n3, the numbers of spores on the carriers exposed the fumigant.
[5]DT, dilution time.
[6]T, the mean number of spores recovered on the control-carriers.

$$T = \frac{x+y+z+w}{2.2} \times 10^2 \times 100$$

(x, y: 10^2 dilution spores; z, w: 10^3 dilution spores)

과를 보였다고 보고하였다. Venczel 등[29]은 유리염소와 산화제 합제를 이용해 *C. perfringens* 아포에 대한 살아포 효과를 확인하기 위한 시험을 수행한 결과, 유리염소와 산화제 합제를 5 mg/L의 농도로 4시간 동안 처리하여, *C. perfringens* 아포가 3log 이상 감소시키는 효과를 나타내었다고 보고하였다.

처리대상, 처리 농도, 그리고 처리시간 등을 고려할 경우, 본 연구에서 사용한 Fumagari OPP®의 *C. perfringens* 아포에 대한 살아포 효과는 Speight 등[28]의 연구결과와 유사하였으나, Udompijitkul 등[27]과 Venczel 등[29]의 연구결과보다는 높았던 것으로 사료된다.

본 연구결과로부터, OPP를 주성분으로 하는 훈증 소독제, Fumagari OPP®는 비다공성의 표면에 부착되어 있는 *C. perfringens* 아포를 4.52log 이상 감소시켜, 오염된 표면의 *C. perfringens* 아포에 대해 효과적으로 살아포할 수 있는 훈증소독제로 사료된다.

본 연구를 통해, OPP를 주성분으로 하는 훈증 소독제의 *C. perfringens* 아포에 대한 살아포 효과를 처음으로 실험실 수준에서 규명하였으며, 향후, *C. perfringens* 아포에 오염된 식품저장소나 환경 중에서 OPP를 주성분으로 하는 훈증 소독제의 적응시험을 통해 그 효과를 규명할 필요가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

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

요 약

본 연구는 20% ortho-phenylphenol을 함유한 훈증소독제, Fumagari OPP®의 *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) 아포에 대한 살아포 효과를 평가하기 위해, French standard NF T 72-281에 따라 수행하였다. 배양 현탁액 중 *C. perfringens*의 아포수(N 값), 훈증소독제에 노출된 각 담체의 아포수(n1, n2, n3), 평판배지법에 의한 시험 아포 현탁액 중 아포수(N1), 여과법에 의한 시험 아포 현탁액 중 아포수(N2), 그리고 대조 담체의 회복 아포의 평균값(T 값)을 예비실험을 통해 구하였다.

또한, 훈증소독제에 노출된 *C. perfringens*의 감소 아포수(d 값)는, T 값, 회복액 중 아포수의 평균값(n'1) 그리고 배지의 담체에서 증식한 아포수의 평균값(n'2) 등을 이용하여 산출하였다. N 값은 4.4×10^7 spores/mL이었으며, n1, n2, n3은 각각 0.5N1, 0.5N2, 0.5N1 보다 높게 나타났다. 그리고 T 값은 4.9×10^5 spores/carrier이었다. 훈증소독제의 살아포 효과에 있어서, d 값은 4.52 이었다. 훈증소독제에 대한 프랑스 기준에 따르면, 효과적인 살균력을 갖는 훈증소독제의 d 값이 3 이상이어야 하는 것으로 규정하고 있다. 본 연구의 결과로부터, Fumagari OPP®는 *C. perfringens* 아포에 대해 높은 살아포 효과를 갖는 것으로 나타나, 병원성 세균의 아포로 오염된 식품재료와 주방기기의 소독에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Chae, H.S., Kim, Y.H., Kim, J.Y., Kim, J.H., Kim, G.H., Choi, T.S., Shin, B.W., Lee, D.J. and Lee, J.H.: Isolation and characterization of *Clostridium perfringens* on bovine and porcine carcass. *Korean J. Vet. Serv.* **29**, 97-102 (2006).
2. Waters, M., Savoie, A., Garmory, H.S., Bueschel, D., Popoff, M.R., Songer, J.G., Titball, R.W., McClane, B.A. and Sarker, M.R.: 2003. Genotyping and pheno typing of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J. Clin. Microbiol*. **41**, 3584-3591 (2003).
3. Young, M.K., Smith, P., Holloway, J. and Davison, R.P.: An outbreak of *Clostridium perfringens* and the enforcement of food safety standards. *Communic. Dis. Intell*. **32**, 462-465 (2008).
4. Osman, K.M., Soliman, Y.A., Amin, Z.M.S. and Aly, M.A.K.: Prevalence of Clostridium perfringens type A isolates in commercial broiler chickens and parent broiler breeder hens in Egypt. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*. **31**, 931-941 (2012).
5. Eriksen, J., Zenner, D., Anderson, S.R., Grant, K. and Kumar, D.: *Clostridium perfringens* in London, July 2009: two weddings and an outbreak. *Euro surveill.* **15**, 19598 (2010).
6. 식품의약품안전처.: 식중독통계시스템 - 원인물질별 통계. Available from: http://www.mfds.go.kr/e-stat/index.do?nMenuCode=31. Accessed May 12, 2014 (2012).
7. Wen, Q. and McClane, B.A.: Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl. environ. Microbiol*. **70**, 2685-2691 (2004).
8. Fernández Miyakawa, M.E., Pistone Creydt, V., Uzal, F.A., McClane, B.A. and Ibarra, C.: *Clostridium perfringens* enterotoxin damages the human intestine *in vitro*. *Infect. Immun*. **73**, 8407-8410 (2005).
9. Birkhead, G., Vogt, R. L., Heun, E. M., Snyder, J. T. and McClane, B. A.: Characterization of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning by quantitative fecal culture and fecal enterotoxin measurement. *J. Clin. Microbiol*. **26**, 471-474 (1988).
10. Udompijitkul, P., Paredes-Sabja, D. and Sarker, M.R.: Inhibitory effects of nisin against *Clostridium perfringens* food poisoning and nonfood-borne isolates. *J. Food Sci*. **77**, M51-56 (2012).
11. Sarker, M.R., Shivers, R.P., Sparks, S.G., Juneja, V.K. and McClane, B.A.: Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**,

3234-3240 (2000).
12. Slavić, D., Boerlin, P. Fabri, M., Klotins, K.C., Zoethout, J.K., Weir, P.E. and Bateman, D.: Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can. J. Vet. Res*. **75**, 89-97 (2011).
13. Chalmers, G., Bruce, H.L., Hunter, D.B., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R., Jiang, Y.F., Prescott, J.F. and Boerlin, P.: Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J. Clin. Microbiol*. **46**, 3957-3964 (2008).
14. Gholamiandehkordi, A., Eeckhaut, V., Lanckriet, A., Timbermont, L., Bjerrum, L., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. and Van Immerseel, F.: Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium. *Vet. Res. Commun*. **33**, 1031-1037 (2009).
15. Kassaify, Z.G., El Hakim, R.G., Rayya, E.G., Shaib, H.A. and Barbour, E.K.: Preliminary study on the efficacy and safety of eight individual and blended disinfectants against poultry and dairy indicator organisms. *Vet. Ital*. **43**, 821-830 (2007).
16. Meckes, M.C. and Rhodes, E.R.: Evaluation of bacteriological indicators of disinfection for alkaline treated biosolids. *J. Environ. Eng. Sci*. **3**, 231-236 (2004).
17. Shams, A.M., O'Connellm H, Arduino, M.J. and Rose, L.J.: Chlorine dioxide inactivation of bacterial threat agents. *Lett. Appl. Microbiol*. **53**, 225-230 (2011).
18. Lindstedt, M., Allenmark, S., Thompson, R.A. and Edebo, L.: Antimicrobial activity of betaine esters, quaternary ammonium amphipheles which spontaneously hydrolyze into nontoxic components. *Antimicrob. Agents Chemother*. **34**, 1949-1954 (1990).
19. Gotvajn, A.Ž. and Zagorc-Končan, J.: Laboratory simulation of biodegradation of chemicals in surface waters: closed bottle and respirometric test. *Chemosphere*, **38**, 1339-1346 (1999).
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. 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).
24. 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).
25. 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).
26. Tanny, G.B., Mirelman, D. and Pistole, T.: Improved filtration technique for concentrating and harvesting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*., **40**, 269-273 (1980).
27. Udompijitkul, P., Alnoman, M. and Sarker, M.R.: Inactivation strategy for *Clostridium perfringens* spores adhered to food contact surfaces. *Food Microbiol*. **34**, 328-336 (2013).
28. Speight, S., Moya, A., Macken, S., Chitnis, R., Hoffman, P.N., Davies, A., Bennett, A. and Walker, J.T.: Evaluation of the sporicidal activity of different chemical disinfectants used in hospitals against *Clostridium difficile*. *J. Hosp. Infect*. **79**, 18-22 (2011).
29. Venczel, L.V., Arrowood, M., Hurd, M. and Sobsey, M.D.: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl. Environ. Microbiol*. **63**, 1598-1601 (1997).