

고삼투압 및 저온 조건에서 sigma factor σ^B 가 *Listeria monocytogenes* biofilm 생성에 미치는 영향

박상규·박 신*
대구대학교 생명환경학부

Effect of Sigma Factor σ^B on Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* in High Osmotic and Low Temperature Conditions

Sang Gyu Park and Shin Park*

Division of Life and Environmental Science, Daegu University

Effects of sigma factor (σ^B) on biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 10403S and σ^B -deficient *sigB* null mutant were studied under high osmotic and low temperature conditions. In brain heart infusion (BHI) medium containing 6% NaCl, wild type 10403S and σ^B -deficient *sigB* null mutant formed biofilms of 6.83 ± 0.38 and 5.33 ± 0.45 log cfu/cm², respectively. *L. monocytogenes* 10403S in BHI medium containing 6% NaCl formed 4.7 times larger biofilm than without NaCl. Culture of *L. monocytogenes* 10403S and *sigB* null mutant at 4°C did not show any significant differences in biofilm formation. The results suggest biofilm formation is activated by σ^B and NaCl, whereas not affected by low temperature stress in *L. monocytogenes* 10403S. More studies are necessary to determine biofilm formation mechanism in osmotolerant *L. monocytogenes*.

Key words: *L. monocytogenes*, biofilm, osmotolerance, cryotolerance

서 론

*Listeria monocytogenes*는 인간과 동물에게 치명적인 질병을 일으키는 그람 양성 세균이다. 인간에게 발생하는 listeriosis는 임신부, 태아, 노약자, 면역 결핍자에게 주로 발병하며, 증상은 노약자와 면역 결핍자에게 수막염, 유행성뇌염, 패혈증을 일으키며, 임신부와 태아에게 임신초기의 경우 자연유산, 임신후기의 경우 사산, 유아패혈증, 수막염을 일으킨다(1,2). *L. monocytogenes*에 심하게 오염된 경우 치사율이 약 20% 정도 되는데, 미국의 경우 매년 2,500명의 *L. monocytogenes* 오염 환자 중 약 500명이 사망하는 것으로 추정되고 있으며 이런 수치는 식품 오염 병원균으로 인한 사망자의 약 10%를 차지하며, 식품오염 병원균 중 가장 많은 사망자를 발생시키고 있다(3).

식품오염 병원균이 인간에게 질병을 일으키기 위해서는 외부의 많은 스트레스 요인으로부터 살아남아야 한다. 외부적인 스트레스 요인으로는 고염, 고당, 건조, 저온, 고산성 등이 있

다. *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 등의 식품병원균은 외부 스트레스에 적응하여 인간에게 질병을 일으키는 특수한 작용기작을 가지고 있는데, 스트레스 관련 sigma factor σ^S 와 σ^B 는 스트레스로부터 세균이 살아남는데 밀접한 관련이 있는 삼투보호물질(osmoprotectant)을 생산하는 유전자와 관련이 있다(4). 스트레스 관련 sigma factor σ^S (*RpoS*)는 특히 *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Y. enterocolitica* 등 그람 음성 세균에서 발견되고 있으며, 외부의 스트레스에 적응하여 병원균을 생존시키고 독성을 발현하는데 중요한 역할을 한다(5,6). 그람 양성 세균에 존재하는 sigma factor σ^B 는 최초로 *Bacillus subtilis*에서 발견된 (7) 이후 *Staphylococcus aureus*(8) 등에서 발견되었으며, 최근에는 σ^B 가 *L. monocytogenes*의 내산성 및 내삼투압성에 영향을 미친다는 보고가 있다(9,10).

한편 많은 식품병원균은 식품공장의 기계기구, 작업대의 표면 등에 부착하여 다층구조의 콜로니를 형성함으로써 외부의 환경적 스트레스로부터 자신을 보호하는 작용기작을 가지고 있는데, 이런 다층의 콜로니를 biofilm이라고 한다(11,12). 식품공장에서 기계기구나 작업대의 표면에 biofilm이 생성되면, 이들 병원균은 세척 및 소독과정에서도 살아남아 인간에게 질병을 일으키는 식품 오염원이 된다. 최근 연구에 의하면 일부 병원균은 수 시간 내에 식품기계기구 및 작업대에 biofilm을 생성할 수 있다고 하며, biofilm 생성 속도는 미생물 균종, 기계기

*Corresponding author: Shin Park, Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Kyongsan-si, Kyungbook 713-714, Korea

Tel: 82-53-850-6751

Fax: 82-53-850-6759

E-mail: spark@daegu.ac.kr

구류 표면의 구조, 온도, 영양분 등에 좌우된다고 한다(11,13,14). 또한 Ziebuhr 등(15)에 의하면 스트레스 관련 sigma factor σ^B 는 *S. aureus*의 biofilm 발현조절에 관련이 있다고 한다.

본 연구는 wild type인 *L. monocytogenes* 10403S와 이 균주로부터 σ^B 를 제거한 *sigB* 돌연변이주(*sigB* null mutant)의 biofilm 생성능을 고삼투압 조건과 저온 조건에서 비교함으로써 스트레스 관련 sigma factor σ^B 가 *L. monocytogenes*의 biofilm 생성에도 영향을 미친다는 것을 증명하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 연구에서 사용된 균주는 *L. monocytogenes*의 wild type인 *L. monocytogenes* 10403S와 이 균주로부터 σ^B 를 제거한 *sigB* 돌연변이주인 *sigB* null mutant(10)를 미국 코넬대학교의 Dr. Martin Wiedmann으로부터 제공받아 사용하였다. 보관용 균주는 Brain Heart Infusion(BHI, Difco) 고체배지로 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

Biofilm 생성판 준비

실험에 사용된 biofilm이 생성되는 판은 두 가지를 사용하였는데, 유리 슬라이드글라스(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)와 보통 식품공장에서 기계기구의 재료로 가장 많이 사용되는 스테인리스스틸(type 304, No.4 finish, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA)(16)을 사용하였다. 슬라이드글라스의 경우 크기가 2.5×7.5 cm이며, 스테인리스스틸의 크기는 2.1×7.8 cm이었다. 준비된 슬라이드글라스와 스테인리스스틸 판은 grease를 제거하기 위해 아세톤으로 세척한 후, 75°C의 2 g/L chlorinated alkali(NaOH, NaOCl) 세척용액(Monarch 1313-SD, H. B. Fuller Co., Minneapolis, USA)(14)에 5분간 침지하였으며, 다시 7.0 g/L phosphoric acid 세척액(Monarch MP-20, H. B. Fuller Co., Minneapolis, USA)에 5분간 침지하였다. 그 후 생성판을 증류수로 헹군 후 공기 건조하였으며, 알루미늄 호일에 싸서 고압 멸균하여 사용하였다.

균 접종 및 biofilm 생성

균의 접종을 위해 *L. monocytogenes* 한 백금이를 50 mL BHI에 옮겨, 37°C에서 하룻밤동안 배양한 후 4°C에서 10분간 원심분리하여(9,000×g) 회수하였으며, 배양균의 회수 시 멸균된 pH 7.4 phosphate-buffered saline(PBS)으로 2회 세척하였다. PBS의 조성은 NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L이다. Biofilm의 생성을 위한 종균은 회수된 균을 멸균 PBS에 현탁하여, spectrophotometer(HP 8452A, USA)를 이용하여 O.D.₆₀₀=0.1로 표준화하여 사용하였다. Biofilm 생성

은 50 mL 멸균 test tube(Nunc tube, Denmark)에 슬라이드글라스 혹은 스테인리스스틸 판을 수직으로 세우고, 여기에 45 mL의 멸균 BHI 액체배지를 넣은 후 O.D.₆₀₀=0.1로 표준화된 *L. monocytogenes* 종균 0.1%를 접종하였으며, 37°C에서 정지 배양하여 biofilm을 생성시켰다.

Biofilm 균수 측정

생성된 biofilm의 균수를 측정하기 위해 배양된 biofilm 생성판을 배양액으로부터 꺼내 50 mL의 멸균수로 부드럽게 흘려 세척하였다. 세척된 biofilm 생성판을 20 mL의 멸균 PBS를 담은 50 mL 멸균 test tube(Nunc tube, Denmark)에 넣어 뚜껑을 닫은 후 bench vortex(Heidolph, Labotech, South Africa)를 이용하여 3분간 vortex함으로써 biofilm을 생성하고 있는 균들을 분리하였다. 또한 실험 목적을 위해 다른 한편으로는 vortex로 현탁시키지 않고 spatula로 균을 직접 긁어서 균을 분리하였다. 분리된 각각의 균 현탁액은 1/10단계 희석법으로 희석하여 BHI agar plate에 100 μL spread시킨 다음 37°C에서 1-2일 배양 후 균수를 측정하였다. 이때 희석 배율은 agar plate 위에 균이 30-300 colony가 될 정도로 희석하였다.

결과 및 고찰

Biofilm 균 분리 방법 비교

L. monocytogenes 10403S와 변이주 *sigB* null mutant의 biofilm 생성능을 비교하기에 앞서, 생성된 biofilm을 생성판으로부터 분리하기 위한 두 가지 방법을 비교 시험하였다. 첫 번째 방법은 vortex를 이용하여 3분간 현탁하였으며, 두 번째 방법은 spatula를 이용하여 균을 직접 긁어서 현탁하였다. 균을 분리 후 생성판에 남아 있는 균의 측정은 면봉으로 남아 있는 균을 완전히 회수한 후 균수를 측정하였다. Table 1은 두 가지 방법으로 균을 분리시켰을 때 분리된 균의 백분율을 나타낸 것인데, spatula를 이용하여 균을 긁었을 경우 99.2%의 균이 생성판으로부터 분리되었으며, vortex로 분리하였을 경우 99.4%의 균이 분리되어 두 가지 방법의 유의차가 없었다. Holy 등(16)은 vortexing, sonication, 그리고 bead-shaking의 세 가지 방법으로 균을 분리하여 plate count를 통해 분리된 균수를 측정하였는데 세 가지 방법에 유의한 차이가 없었다. 본 실험에서도 vortex 및 spatula를 이용한 방법을 비교한 결과 유의한 차이가 없었는데, 작업성 및 작업시 균의 오염 정도에 있어서는 spatula를 이용하여 균을 긁는 것 보다 vortex를 이용하는 방법이 작업상 편리하고 균의 오염 확률이 적었다.

Biofilm 생성판 비교

Biofilm이 생성되는 판의 biofilm 생성 정도를 비교하기 위해 스테인리스스틸(type 304, No.4 finish)과 슬라이드글라스 두 가

Table 1. Comparison of two dislodging method of *Listeria monocytogenes* biofilm

Dislodging method	Sample	Cell numbers (log cfu/cm ²)	Percent (%)
Scraping with spatula	Dislodged suspension	6.067 ± 0.040	99.2
	Residue biofilm ¹⁾	3.976 ± 0.073	0.8
Vortexing	Dislodged suspension	6.252 ± 0.006	99.4
	Residue biofilm	3.986 ± 0.218	0.6

¹⁾Residue biofilm was removed with cotton swabs and vortexed for 5 min.

Biofilm was formed on slide glass for 4 days at 37°C and experiments were replicated twice.

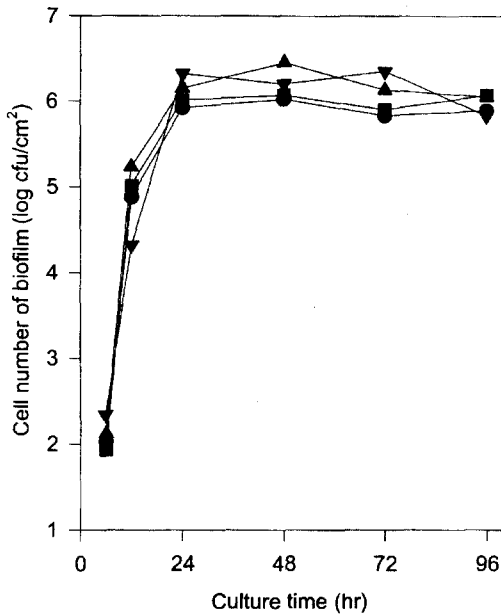


Fig. 1. Evaluation of biofilm formation for *L. monocytogenes* 10403S (WT) and the *sigB* null mutant (MT) on slide glass and stainless steel surfaces.

-●-: Slide glass+WT, -■-: Slide glass+MT, -▲-: Stainless steel+WT, -▼-: Stainless steel+MT.

지를 비교 실험하였는데, Fig. 1은 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant를 두 가지 생성판에서 biofilm 생성능을 비교한 결과이다. 슬라이드글라스에서 *L. monocytogenes* 10403S는 6시간, 12시간, 24시간 및 72시간 배양 시 각각 2.03 ± 0.28 log cfu/cm², 4.88 ± 0.15 log cfu/cm², 5.92 ± 0.34 log cfu/cm², 5.83 ± 0.47 log cfu/cm²의 biofilm을 생성하였다. Biofilm은 균 배양 24시간 후 거의 생성이 완성되었으며, 그 이후로는 별로 증가하지 않았다. 스테인리스스틸에서 *L. monocytogenes* 10403S의 biofilm 생성은 6시간, 12시간, 24시간 및 72시간 배양 시 각각 2.12 ± 0.11 log cfu/cm², 5.23 ± 0.42 log cfu/cm², 6.15 ± 0.28 log cfu/cm², 6.13 ± 0.51 log cfu/cm²의 biofilm을 생성하였는데, 슬라이드글라스에 비해 biofilm 생성이 다소 높은 경향을 보였으나 유의차는 없었다. *L. monocytogenes sigB* null mutant의 경우도 비슷한 경향을 보였다. Roy 등(17)은 scanning electron microscope를 사용하여 *L. monocytogenes*의 biofilm을 조사한 결과 스테인리스스틸, 글라스, 폴리프로피렌, 고무 등에서 biofilm이 생성되었으며, 생성된 표면의 고유한 성질에 따라 biofilm의 생성이 영향을 받는다고 하였다. 또한 Schraft 등(13)은 13종의 *L. monocytogenes*에 대해 glass slides 상에서 biofilm을 형성한 결과 24 h후 3.88 - 5.69 log cfu/cm² 정도의 biofilm을 형성하여 본 연구 보다는 다소 적게 생성되었는데 사용한 배지의 차이에 의해 다소 차이가 난 것이 아닌가 사료된다.

고삼투압 조건에서 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant의 biofilm 생성능 비교

Sigma factor σ^B 는 그람 양성 세균에 존재하며 삼투압 스트레스 시 삼투보호물질을 생산하는 유전자와 관련이 있는데(4), 보통의 세포가 생존할 수 없는 약조건에서도 glycine betaine 등을 세포내에 축적하여 세포가 살아남을 수 있는 작용기작을 부여한다. 본 실험에서는 *L. monocytogenes*가 biofilm을 생성하는

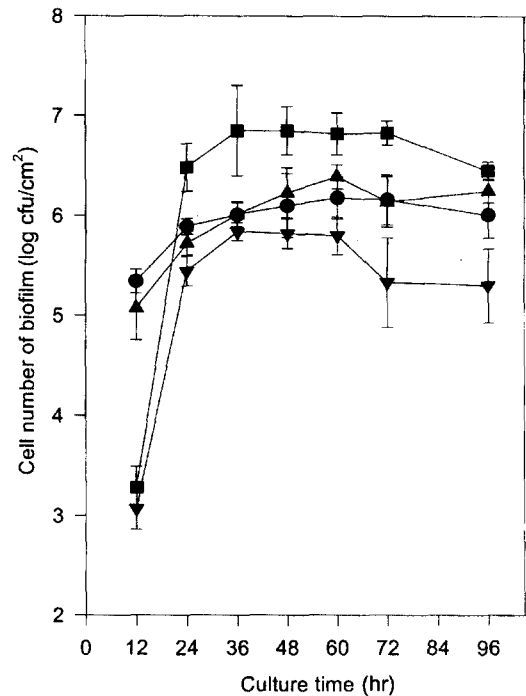


Fig. 2. Biofilm formation of *L. monocytogenes* 10403S (WT) and the *sigB* null mutant (MT) on slide glass in osmotically stressed condition.

-●-: WT+No NaCl, -■-: WT+6% NaCl, -▲-: MT+No NaCl, -▼-: MT+6% NaCl.

데 σ^B 가 어떤 영향을 미치는가를 구명하기 위해 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant의 biofilm 생성능을 고삼투압 조건에서 비교하였다. Fig. 2는 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant를 NaCl을 첨가하지 않은 배지와 6%의 NaCl을 첨가한 배지에서 배양하여 슬라이드글라스 상에서 biofilm 생성을 비교한 결과인데, NaCl을 첨가하지 않은 BHI 배지에서 배양된 *L. monocytogenes* 10403S는 배양 72시간 후 6.16 ± 0.25 log cfu/cm²의 biofilm을 생성하였으며, *sigB* null mutant의 경우는 6.14 ± 0.25 log cfu/cm²의 biofilm을 생성하였는데, 삼투압 스트레스가 없을 시는 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant의 biofilm 생성능에 유의한 차이가 없었다. 반면 고삼투압 조건인 6%의 NaCl이 첨가된 BHI 배지에서 배양된 *L. monocytogenes* 10403S는 배양 72시간 후 6.83 ± 0.38 log cfu/cm²의 biofilm을 생성하였으며, *sigB* null mutant의 경우는 5.33 ± 0.45 log cfu/cm²의 biofilm을 생성하여서 *L. monocytogenes* 10403S가 *sigB* null mutant보다 31.8배나 더 많은 biofilm을 생성하였다. 따라서 *L. monocytogenes* 10403S와 같이 σ^B 가 존재하는 경우는 *sigB* null mutant 보다 고삼투압 조건에서 biofilm을 많이 생성하여, σ^B 가 삼투압 스트레스 시 biofilm의 생성에 영향을 미친다고 추정할 수 있었다.

다른 한편으로 동일 균주에 대해 NaCl 첨가 유무에 따른 biofilm 생성능을 고찰해 보면, *sigB* null mutant는 6%의 NaCl이 첨가된 경우 배양 72시간 후 5.33 ± 0.45 log cfu/cm²의 biofilm을 생성하여, NaCl이 첨가되지 않은 경우의 6.14 ± 0.25 log cfu/cm²보다 불과 0.16배의 biofilm을 생성하였다. 이는 *sigB* null mutant의 경우 스트레스에 관여하는 σ^B 가 존재하지 않아 고삼투압 조건에서 균중식이 더욱 저해되고 그 결과 biofilm도 적게 생성되었다고 사료된다. 반면 *L. monocytogenes* 10403S는

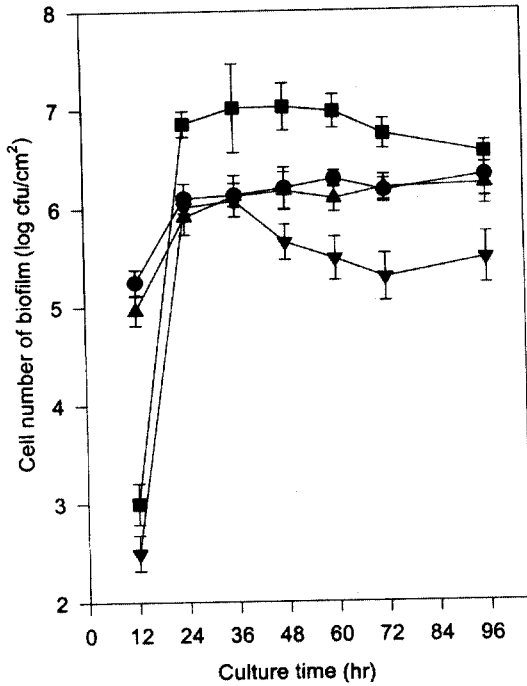


Fig. 3. Biofilm formation of *L. monocytogenes* 10403S (WT) and the *sigB* null mutant (MT) on stainless steel in osmotically stressed condition.

-●-: WT+No NaCl, -■-: WT+6% NaCl, -▲-: MT+No NaCl, -▼-: MT+6% NaCl.

6%의 NaCl이 첨가된 경우 배양 72시간 후 $6.83 \pm 0.38 \log \text{cfu/cm}^2$ 의 biofilm을 생성하여, NaCl이 첨가되지 않은 경우의 $6.16 \pm 0.25 \log \text{cfu/cm}^2$ 보다 4.7배나 많은 biofilm을 생성하였다. 일반적으로 *L. monocytogenes*는 NaCl의 농도가 증가함에 따라 그 생육속도가 감소한다. Smith 등(18)은 NaCl의 농도가 0, 2, 4, 8% 일때 *L. monocytogenes*의 생육속도는 각각 0.35, 0.22, 0.13, 0.0080 h^{-1} 라고 하였는데, NaCl이 6%일때 생육속도는 NaCl 0% 일때에 비해 1/3 이하일 것이라고 추정할 수 있다. 그럼에도 불구하고 6%의 NaCl이 첨가된 배지에서 biofilm이 4.7배나 더 많이 생성된 것은 σ^B 가 고삼투압 조건에서 biofilm 생성을 증가시킨다는 사실을 보다 확실히 뒷받침하고 있다. Fig. 3은 스테인리스스틸 상에서 고삼투압 조건이 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant의 biofilm 생성에 미치는 영향을 조사한 결과인데, Fig. 2의 슬라이드글라스 상에서의 결과와 유사하였다. 즉 고삼투압 조건이 아닌 NaCl을 첨가하지 않은 배지에서 배양한 경우 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant는 biofilm 생성능에 유의한 차이가 없었다. 반면 6% NaCl이 첨가된 고삼투압 조건에서 배양된 경우 *L. monocytogenes* 10403S는 *sigB* null mutant 보다 44.7배나 많은 biofilm이 생성되었다. 이상의 결과를 종합하면 sigma factor σ^B 는 고삼투압 조건에서 *L. monocytogenes*의 biofilm 생성을 증가시키는데 직접적인 관련이 있다고 판단할 수 있다.

저온 조건에서 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant의 biofilm 생성능 비교

*L. monocytogenes*는 인간에게 질병을 일으키는 병원균으로서 고삼투압 조건에서도 살아남을 수 있으며, 더욱이 저온에서도 살아남을 수 있는 식품안전성 면에서 매우 치명적인 균이라고

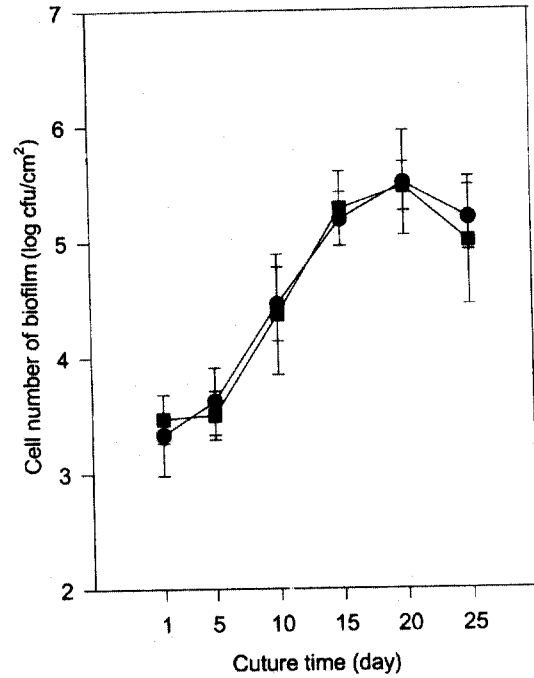


Fig. 4. Biofilm formation of *L. monocytogenes* 10403S (-●-) and the *sigB* null mutant (-■-) cultured at 4°C.

할 수 있다. 본 실험에서는 고삼투압 조건과 마찬가지로 저온 조건에서도 σ^B 가 biofilm 생성에 영향을 미치는지를 조사하였다. Fig. 4는 저온 조건이 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant의 biofilm 생성에 미치는 영향을 조사한 결과인데, *L. monocytogenes* 10403S는 1일, 10일 및 20일 배양 시 각각 $3.33 \pm 0.35 \log \text{cfu/cm}^2$, $4.46 \pm 0.32 \log \text{cfu/cm}^2$, $5.50 \pm 0.45 \log \text{cfu/cm}^2$ 의 biofilm을 생성하였으며, *sigB* null mutant는 같은 조건에서 배양 시 각각 $3.47 \pm 0.21 \log \text{cfu/cm}^2$, $4.37 \pm 0.52 \log \text{cfu/cm}^2$, $5.47 \pm 0.21 \log \text{cfu/cm}^2$ 의 biofilm을 생성하여 저온조건에서 *L. monocytogenes* 10403S와 *sigB* null mutant의 biofilm 생성에는 유의한 차이가 없었다. 따라서 저온 조건하에서는 σ^B 가 biofilm 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 이런 결과는 σ^B 와 저온스트레스의 연관성에 관한 연구 보고가 지금까지 전무하다는 사실과도 무관하지 않다고 사료된다.

요 약

*L. monocytogenes*가 biofilm을 생성하는데 σ^B 가 어떤 영향을 미치는가를 구명하기 위해 *L. monocytogenes* wild type인 10403S와 σ^B 를 제거한 *sigB* null mutant의 biofilm 생성능을 고삼투압 및 저온 조건에서 비교하였다. 고삼투압 조건인 6%의 NaCl이 첨가된 BHI 배지에서 배양된 *L. monocytogenes* 10403S는 배양 72시간 후 $6.83 \pm 0.38 \log \text{cfu/cm}^2$ 의 biofilm을 생성하였으며, *sigB* null mutant의 경우는 $5.33 \pm 0.45 \log \text{cfu/cm}^2$ 의 biofilm을 생성하였는데, *L. monocytogenes* 10403S가 *sigB* null mutant보다 31.8배나 많은 biofilm을 생성하였다. 또한 *L. monocytogenes* 10403S를 6%의 NaCl이 첨가된 BHI 배지에서 배양했을 시 NaCl을 첨가하지 않은 배지에서 배양한 경우보다 4.7배나 많은 biofilm을 생성하였는데, *L. monocytogenes* 10403S와 같이 σ^B 가 존재하는 경우 고삼투압 조건에서 biofilm을 더욱 많이 생성하였으며, σ^B 가 biofilm의 생성에 영향을 미친다고 할

수 있었다. 또한 저온 조건(4°C 배양)에서 σ^B 가 biofilm 생성에 영향을 미치는지를 조사하였는데, σ^B 는 저온 스트레스 시 biofilm 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2001학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의한 논문이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Farber JM, Losos JZ. *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. CMAJ 138: 413-418 (1988)
- Riedo FX, Pinner RW, Tosca DL, Cartter ML, Graves LM, Reeves MW, Weaver RE, Plikaytis BD, Broome CV. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J. Infect. Dis. 170: 693-696 (1994)
- Mead P, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emer. Infect. Dis. 5: 607-625 (1999)
- Loewen PC, Hengge-Aronis R. The role of sigma factor σ^B (katF) in bacterial global regulation. Annu. Rev. Microbiol. 48: 53-80 (1994)
- Cheville AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng CM, Kasper CW. RpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1822-1824 (1996)
- Dineen SS, Takeuchi K, Soudah J, Boor K. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. J. Food Prot. 61: 1602-1608 (1998)
- Haldenwang WG, Losick R. Novel RNA polymerase σ factor from *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7000-7004 (1980)
- Wu S, de Lencastre H, Tomasz A. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J. Bacteriol. 178: 6036-6042 (1996)
- Becker LA, Cetin-Mehmet S, Hutkins RW, Bemson AK. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigma B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. J. Bacteriol. 180: 4547-4554 (1998)
- Wiedmann M, Arvik TJ, Hurley RL, Boor KJ. General stress transcription factor σ^B and its role in acid resistance and virulence of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 180: 3650-3656 (1998)
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322 (1999)
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54: 49-79 (2000)
- Chae MS, Schraft H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. Int. J. Food Microbiol. 62: 103-111 (2000)
- Jeong DK, Frank JF. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21°C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 27: 415-424 (1994)
- Rachid S, Ohlsen K, Wallner U, Hacker J, Hecker M, Ziebuhr W. Alternative transcription factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. J. Bacteriol. 182: 6824-6826 (2000)
- Lindsay D, Holy AV. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. Food Microbiol. 14: 383-390 (1997)
- Mafu AA, Roy D, Goulet J, Magny P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. J. Food Prot. 53: 742-746 (1990)
- Ko R, Smith LT, Smith GM. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 176: 426-431 (1994)

(2004년 2월 19일 접수; 2004년 4월 21일 채택)