

## 공초점 현미경 및 유세포 분류기를 이용한 계육에서의 *Salmonella*균 불활성화 평가

장금일 · 정덕화<sup>1</sup> · 하상도<sup>2</sup> · 김근성<sup>2</sup> · 이규호<sup>3</sup> · 김민곤<sup>4</sup> · 김철호<sup>5</sup> · 김광엽\*

충북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>경상대학교 응용생명과학부, <sup>2</sup>중앙대학교 식품공학과,  
<sup>3</sup>한국외국어대학교 환경학과, <sup>4</sup>한국생명공학연구원, <sup>5</sup>성균관대학교 생명공학부

### Assessment of Inactivation for *Salmonella* spp. on Chicken Meat using Confocal Laser Microscopy and Flow Cytometry

Keum-Il Jang, Duck-Hwa Chung<sup>1</sup>, Sang-Do Ha<sup>2</sup>, Keun-Sung Kim<sup>2</sup>, Kyu-Ho Lee<sup>3</sup>,  
Min-Gon Kim<sup>4</sup>, Cheorl-Ho Kim<sup>5</sup>, and Kwang-Yup Kim\*

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

<sup>1</sup>Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

<sup>3</sup>Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Hankuk Univ. of Foreign Studies

<sup>4</sup>Laboratory of Integrative Biotechnology, Korea research Institute of Bioscience and Biotechnology

<sup>5</sup>Department of Biological sciences, College of Natural Science, Sungkyunkwan University

**Abstract** Inactivation rates of *Salmonella enteritidis* *in vitro* and *in vivo* were assessed using confocal microscopy and flow cytometry. *S. enteritidis* was inactivated with 1% (w/v) trisodium phosphate (TSP) and live cells, and inactive cells were distinguished by staining with fluorescent probe, LIVE/DEAD BacLight Bacteria Viability stain. After TSP treatment for 1 min, most of *Salmonella* cells changed from green (live cells) fluorescence to red (inactive cells) fluorescence, indication of effective sanitizing. Inactivation efficiency and contamination sites of *S. enteritidis* on chicken skin by TSP treatment were assessed using confocal laser microscopy. Precise flow cytometry histograms for viability changes of *S. enteritidis* after TSP treatments were obtained. Efficiency of various sanitizer treatments on foodborne pathogens could be assessed using this method.

**Key words:** *Salmonella enteritidis*, confocal microscopy, flow cytometry, assessment, trisodium phosphate

## 서 론

최근 소비자의 의식 수준이 발전하면서 일반적인 식품위생환경은 많이 향상되었으나, 식생활양식이 변화하면서 육류 식품의 소비가 늘고 외식이 많아짐에 따라 식중독성 병원균에 의한 식중독 사고의 위험은 증가하고 있는 실정이다. 특히 식중독성 병원균 중 *Salmonella*균에 의해 발생하는 salmonellosis는 가장 빈번하게 발생하는 식중독이며, 식품 중에 오염되어 감염량 이상으로 증식하게 되면 오염된 식품을 섭취시 식중독을 일으키는 대표적인 세균성 식중독균으로 알려져 있다. 따라서 salmonellosis를 초기에 예방하기 위해서는 식품 중에 오염되어 있는 *Salmonella*균을 불활성화 시킴으로써 증식을 억제 시킬 수 있는 방법이 매우 필요하다고 볼 수 있다.

이와 같은 방법을 개발하기 위해 다양한 위생제를 이용하여 *Salmonella*균을 불활성화 시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있

는데, 주로 열탕처리(1-3), 염소 처리(1,2,4-7), 유기산 처리(1,2,8-11), 과산화수소(12,13) 및 4급 암모늄 화합물 처리(8,9,14), bacteriocin 처리(15-17) 등에 의한 불활성화가 대부분이었고, 최근에 cetylpyridinium chloride(REG), trisodium phosphate(GRAS/FS), nisin(GRAS)을 이용한 불활성화 연구가 주목을 받고 있는데, Breen 등(18)은 cetylpyridinium chloride를 이용하여 가금류 식품에서 *Salmonella typhimurium*을 제거하였다고 보고하였고, Seong(19)은 nisin과 trisodium phosphate를 이용하여 계육에서 *Listeria monocytogenes*를 불활성화 하였다고 보고하였으며, Chung 등(20)은 nisin 처리로 육류에서 식중독균의 부착을 방지할 수 있다는 보고와 nisin과 열처리의 상승효과로 계육에서 *Listeria monocytogenes*를 감소 시켰다고 보고하였다. 그리고 Hwang 등(21)은 lactic acid, trisodium phosphate(TSP), NaOH 등 다양한 화합물을 이용한 계육의 오염방지에 관한 연구보고를 하였고, Xiong 등(22)은 trisodium phosphate와 lactic acid 등의 분무 처리를 통해 계육에 부착되어진 *Salmonella enteritidis*의 억제효과를 보고하였다. 또한 Kim 등(23)은 초산과 trisodium phosphate를 닭고기에서 처리하여 냉장동안의 gram 음성균의 억제효과를 보고하였다. 그러나 일반적으로 위생제 처리에 의한 *Salmonella*균의 불활성화 평가는 기존의 plate 방법과 같은 *in vitro* 방법에 의한 평가에 의존하고 있는 실정이다. 또한, 배양되지는 않지만 *in vivo* 상태에서 생존이 가능한 VBNC(viable but non-culturable) 형태의 *Salmonella*균(24,25)과 위

\*Corresponding author: Kwang-Yup Kim, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Tel: 82-43-261-2568

Fax: 82-43-271-4412

E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr

Received October 4, 2005; accepted January 19, 2006

생체 처리에 의해 손상을 입었지만 불활되지 않고 잔존하다가 일정 환경이 되면 회복되는 경우 회복시간이 필요하다는 보고(26,27)에서와 같이 *Salmonella*균의 특성, 배양 환경의 영양 상태 및 적응성 등의 다양한 변수 때문에 *in vitro* 방법으로는 식품 중에 존재하는 식중독균에 대한 불활성화 효과를 정확하게 분석하기에는 매우 미흡한 실정이다. 그러므로 다양한 위생제 처리에 의한 식품 중 *Salmonella*균의 불활성화 효과에 대해 보다 정확한 평가를 하기 위한 방법이 필요하다.

최근 세포 및 세균의 viability를 직접적으로 측정하기 위해 공초점 현미경(CLSM, confocal scanning laser microscopy) 및 유세포 분류기(flow cytometry)가 사용되어지는데, CLSM은 광학현미경이나 형광현미경보다 명확한 입체적인 조직영상을 얻을 수 있고(28), 레이저 광투과에 의한 표면내부의 '스캔' 기능, 다양한 면역학적 형광염료를 사용하여 얻어지는 다색영상화(multi-color imaging), 비파괴적 전처리에 의한 생세포의 관찰, 컴퓨터그래픽을 이용한 3차원 영상 구성 등의 장점이 많은 신기술이다(29,30). 이 기술을 이용하여 닭의 표피 모공에 포집된 *Salmonella*균의 공간적인 영상이 3차원적으로 관찰되었으며(29), 전자현미경에서는 얻지 못했던 계란 난막의 limiting membrane 입체 영상도 보고되었다(30). 그리고, flow cytometry는 488 nm(blue), 514 nm(green)의 두 가지 파장을 내는 Ar Ion laser를 이용하여 형광 염색소에 염색된 유액 상태의 시료가 감지지역(sensing point)를 통과할 때 주사함으로써 발생하는 굴절 laser와 형광을 각각의 detector에 의해 검출하여 컴퓨터로 분석하는 기술로서 굴절 laser는 forward scatter (0.5-10°, 시료의 크기 측정)와 side scatter(11-90°, 시료의 granularity 측정)의 두 가지 검출방법이 있고, 형광검출은 다양한 filter를 이용하여 각 파장대의 형광을 분리할 수 있어 이를 통하여 detector로 신속하게 검출할 수 있으며, 이는 즉각적인 검출분석이 가능하기 때문에 시료가 감지 지역을 통과하자마자 각각의 검출 자료에 따라 sorting이 가능하다는 장점이 있는 기술이다(31,32). 또한, Molecular Probes의 Live/Dead BacLight Bacterial Viability probe(L-7007)는 SYTO 9과 propidium iodide로 구성되어 있는데, SYTO 9는 세균의 plasma membrane을 손상시키지 않고 침투하여 DNA와 결합함으로써 녹색형광을 나타내고, propidium iodide는 plasma membrane이 손상되어 있는 경우에만 침투하여 DNA와 결합함으로써 적색의 형광을 나타내기 때문에 세균의 활성상태 및 불활성화 상태를 나타낼 수 있는 형광염색물질로 알려져 있다(33).

따라서 본 연구에서는 식품 중 *Salmonella*균의 불활성화에 대한 정확한 평가 방법을 모색하기 위한 첫 단계로 *in vitro* 방법을 통한 평가에서 문제시 되고 있는 다양한 변수를 배제시키고자 Live/Dead BacLight Bacterial Viability probe를 이용한 염색방법과 CLSM과 flow cytometry를 이용하여 *Salmonella*균의 오염부위 및 위생제의 불활성화 효과를 분석하고, *in vivo* 상태에서 적용함으로써 계육에서 위생제 처리에 의한 *Salmonella*균의 불활성화를 viability 측면에서 직접적으로 평가할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물 배양 및 계육

*Salmonella enteritidis* KCCM 12021을 한국미생물보존센터에서 분양받아 LB broth(Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 접종하여, 37°C에서 24시간 배양 후 사용하였다. 그리고 균체의 보관은 LB agar에 도말한 후 4°C에 보관하여 7일마다 계대 배양하였다. 그리고 계육은 시중에서 판매되고 있는 닭을 구입하여 사용하였다.

### CLSM을 이용한 계육에서 *Salmonella*균의 오염 부위 관찰

계육에서 *Salmonella*균의 오염부위는 Kim의 방법(29)을 이용하여 관찰하였다. 먼저 10<sup>8</sup> CFU/mL로 배양된 1 mL의 *Salmonella enteritidis*를 4000 rpm으로 5 min 동안 원심분리(micro high speed centrifuge VS-15000CFN, Vision Scientific, Buchon, Korea)하고, 0.03%(w/v) FITC(fluorescein isothiocyanate, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 10분간 염색한 후 멸균증류수로 원심분리(4000 rpm, 5 min)하여 3회 수세하였다. 그리고 계육의 가슴부위의 표피를 멸균된 칼과 테프론으로 피복된 핀셋을 이용하여, 1×1 cm<sup>2</sup>로 떼어내 0.1%(w/v) pyronin Y(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 10분간 염색을 하고, 멸균증류수에 1분간 침지, 3회 수세를 한 후 slide glass에 올려놓고 풍건시켰다. 그리고 FITC로 염색되어진 *Salmonella enteritidis*를 pyronin Y로 염색된 계육의 표피에 접종하고, 15분간 정치시켜 부착시킨 다음, 5 mL 피펫으로 멸균증류수를 흘려 세척한 후 cover glass로 덮고 테이프로 고정시켰다. 그리고 confocal laser scanning microscopy(CLSM, MRC-1024, Bio-Rad Inc., Kr/Ar Ion Laser)를 이용하여 optical sectioning으로 오염 부위와 흡착 상태를 관찰하였다.

### CLSM과 Flow cytometry를 이용한 *Salmonella*균의 불활성화 평가

37°C에서 24시간 동안 LB broth에서 배양된 1 mL의 *Salmonella enteritidis*를 원심분리(4000 rpm, 5 min)하여 배지성분을 제거한 다음, 동량의 1%(w/v) TSP(trisodium phosphate, Sigma, St. Louis, MO, USA) solution을 이용하여 1분간 *Salmonella enteritidis*를 불활성화 시켰다. 그리고 불활성화된 *Salmonella enteritidis*를 원심분리(4000 rpm, 5 min)하여 균주만 회수하고 멸균증류수로 원심분리(4000 rpm, 5 min)하여 2회 수세한 후 최종 100 µL가 되도록 조 절하였다. 그리고 동량의 LIVE/DEAD BacLight Bacteria Viability probe(L-7007, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)(33)를 *Salmonella enteritidis*에 첨가하여 10분간 염색하고, slide glass에 100 µL를 올려놓은 다음, cover glass로 덮고 테이프로 고정한 후 CLSM의 optical sectioning을 이용하여 *Salmonella enteritidis*의 불활성화 효과를 관찰함과 동시에 flow cytometry(FACSCalibur, Becton Dickinson, Ar Ion laser)의 FL1(530±15 nm, green color filter)과 FL3(650 nm 이상, red color filter) 결과를 서로 비교하여 TSP에 의한 *Salmonella*균의 불활성화 효과를 관찰하였다.

### 계육 표면에서의 *Salmonella*균의 직접적인 불활성화 평가

계육의 가슴 부위 표피를 멸균된 칼과 테프론으로 피복된 핀셋을 이용하여 1×1 cm<sup>2</sup>로 떼어내어, LB 배지에서 24시간 동안 배양시킨 *Salmonella enteritidis* 배양액에 각각 15분간 넣어 오염시켰다. 그리고 5 mL 피펫으로 멸균증류수를 흘려보냄으로써 계육 표피에 부착되지 않은 균을 세척한 후 대조구로서 TSP를 처리하기 전에 LIVE/DEAD BacLight Bacteria Viability probe(L-7007)로 염색하였고, 불활성화를 비교하기 위해 1%(w/v) TSP solution에 5분간 침지시켜 불활성화를 유도한 후 5 mL 피펫으로 멸균증류수를 흘려 수세하였다. 그리고 LIVE/DEAD BacLight Bacteria Viability probe(L-7007)로 염색하고, 대조구와 함께 slide glass에 올려놓은 다음, cover glass로 덮고 테이프로 고정시켜 계육에 오염된 *Salmonella*균에 대한 불활성화 효과를 CLSM의 optical sectioning 방법으로 비교 관찰하였다.

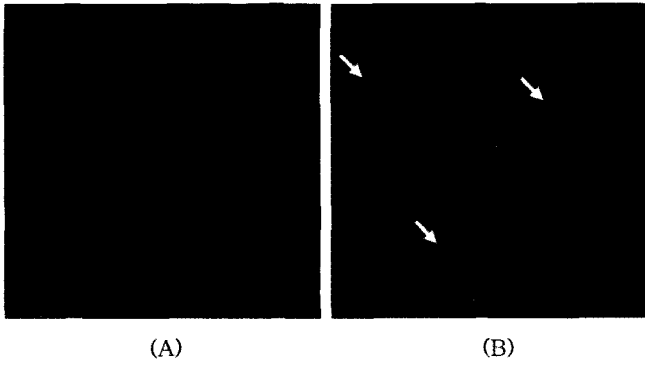


Fig. 1. Optical sectioning images of chicken breast skin surface before (A) and after (B) inoculation with *Salmonella enteritidis* (arrow) by CLSM.

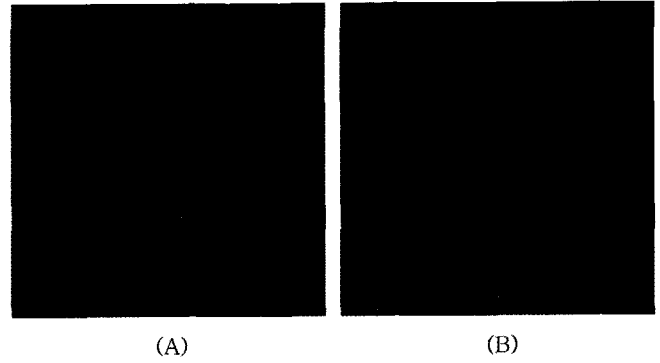


Fig. 2. Viability assessment of *Salmonella enteritidis* after TSP 1% (w/v) treatment using CLSM multicolor imaging. (A) Live cell in green color (SYTO9), (B) Dead cell in red color (propidium iodide).

## 결과 및 고찰

### 계육에서 *Salmonella*균의 오염 부위 관찰

계육의 가슴 부위 표피에서 *Salmonella enteritidis*의 오염부위는 평평한 표면 부위보다는 모공 또는 피부 표면의 주름진 틈 사이에 20~30  $\mu\text{m}$  안쪽으로 들어가 부착되거나 수분에 의해 포집되어 존재하였다(Fig. 1). Kim 등(29)이 보고한 계육에서 *Salmonella*균의 오염 부위와 비슷한 오염부위로, 계육에서 *Campylobacter*균이 주로 표피의 주름진 틈 사이에서 부착되어 존재하며, 모공 주변의 수분에 포집되어 존재한다는 Jang 등(34)의 보고와 lean 또는 fat 조직에 식중독성 미생물이 부착되는 동안 경쟁적인 상호작용은 없다는 Chung 등(35)의 보고로 미루어 볼 때, 다른 식중독균도 함께 오염되었을 경우 서로 공존할 것으로 사료되어진다. 또한 식중독성 세균의 부착은 완전히 밝혀지지 않았지만, 세균의 특성과 기질의 특성에 따라 복합적으로 이루어지는데(1), Thomas 등(36)은 조직의 수분 흡수과정에 의해 계육의 근육 조직에 균이 부착된다고 하였고, Lillard(37)는 세균의 운동성 및 편모에 의해 부착된다고 하였으며, Dickson과 Koochmarie(38)는 세균 세포벽의 음전하와 세균의 상대적 소수성에 의하여 부착된다고 보고하였다. 이와 같은 다양한 특성과 계육의 성분 및 균의 적응성과 같은 다양한 변수에 의해 계육에서 *Salmonella*균의 오염 경로와 활성상태에서 생존하지만 배양이 되지 않는 VBNC 상태로의 변환과 같은 현상이 좌우 된다고 볼 수 있다. 따라서 이와 같은 다양한 변수 때문에 식중독을 예방하기 위해 처리되는 위생제의 효과를 plate 법과 같은 *in vitro* 방법으로는 정확하게 평가하기 어려울 것으로 사료되며, 식품 중에서 직접적으로 불활성화 효과를 평가할 수 있는 방법이 필요하다고 볼 수 있다.

### CLSM과 Flow cytometry 이용한 *Salmonella*균의 불활성화 평가

Trisodium phosphate(TSP) 처리에 의한 *Salmonella*균의 불활성화를 CLSM과 flow cytometry 이용하여 관찰한 결과, CLSM에서는 1%(w/v) TSP로 1분간 처리하였을 때, *Salmonella*균은 대부분 불활성화되어 대조구의 녹색형광과 대조적으로 적색의 형광을 나타내었다(Fig. 2). 또한 flow cytometry에서 초기 녹색형광으로 모여 있던 활성상태에서 TSP 처리 후에는 불활성화가 되었을 때 나타나는 적색의 형광으로 모이는 변화를 나타내어 TSP 처리에 의한 *Salmonella*균의 불활성화 현상을 분석하였다(Fig. 3). 다양한 조건에 의해 생존하지만 배양이 되지 않는 VBNC 상태로 변환된 *Salmonella*균이 장시간 생존이 가능하다는 보고(26,27)로 미루어 볼 때, 위생제 처리에 의한 *Salmonella*균의 불활성화 정도를

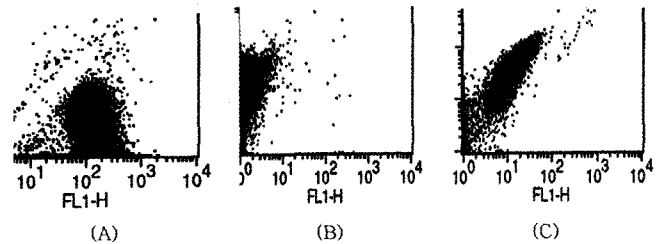


Fig. 3. Flow cytometry histogram for the viability changes of *Salmonella enteritidis*. (A) Live cells, (B) Dead cells, and (C) *Salmonella* cells after 1% (w/v) TSP treatment for 1 min.

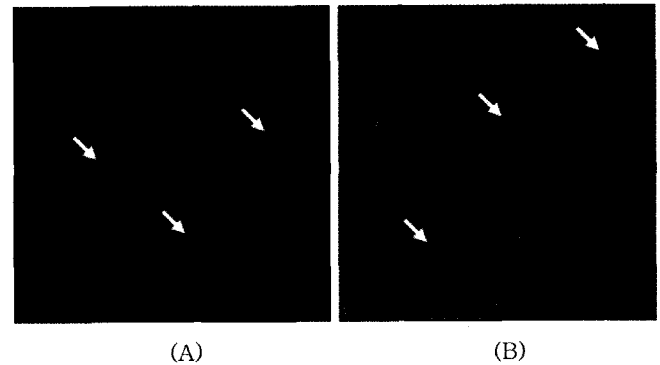


Fig. 4. Assessment of viability for *Salmonella* cells (arrow) using CLSM after 1% (w/v) TSP treatment for 5 min on chicken breast skin. (A) Live cell in green color (SYTO9), (B) Dead cell in red color (propidium iodide).

plate 방법으로는 정확하게 평가하기 어렵지만, 이와 같은 결과를 통해 다색 영상화 방법을 이용한 염색방법으로 다양한 위생제 처리의 효율성을 cell viability 측면에서 직접적으로 평가할 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 이와 같은 염색방법을 이용한다면 계육 표면 내에 오염되어 있는 균에 대하여 위생제 처리시에도 그 효과를 신속하고 명확하고 직접적인 평가가 가능하다고 예상할 수 있었다.

### 계육 표면에서 위생제 처리에 의한 *Salmonella*균의 불활성화 평가

불활성화 효과가 높게 나타난 trisodium phosphate를 *Salmonella*균으로 오염된 계육에 처리하여 cell viability 측면에서 그 효율성을 평가한 결과(Fig. 4), *Salmonella*균은 계육에서 오염부위로

확인된 모공이나 표피의 주름진 틈 사이에서 불활성화되어 적색의 형광을 나타내었다. 이는 계육의 표피에 존재하는 다양한 유기물 등의 영양분이 존재하여도 TSP 처리에 의해 불활성화 되어 짐과 동시에 오염부위에서 직접 TSP에 영향을 받아 위치적으로 어떠한 변화도 나타나지 않는다는 현상을 직접적으로 확인한 결과라고 사료된다. 또한 이와 같은 방법으로 현재 연구되고 있는 다양한 위생제 처리에 대한 불활성화 효과를 분석할 수 있을 것으로 예상되어 진다. 그리고 계육에서 다양한 식중독균의 직접적인 오염경로로 알려진 냉각수(39)에 식중독성 세균에 대한 불활성화 효과가 확인된 위생제를 처리한다면 현저한 위생효과가 나타날 것이라고 추측된다. 본 연구를 통하여 계육에서의 식중독성 병원균인 *Salmonella*균에 대해 위생처리에 의한 불활성화 효과를 영상화면을 통한 cell viability 측면에서 직접 평가할 수 있었으며, trisodium phosphate가 가공류 식품에서 식중독성 병원균의 오염 방지 및 불활성화 시키는데 적합한 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과를 통해 가공류 식품에서 식중독성 병원균의 오염 방지 및 불활성화를 시킬 수 있을 뿐만 아니라 불활성화 효과를 직접적으로 신속하게 분석할 수 있는 기반과 방안을 마련하였다고 사료되어진다.

## 요 약

본 연구에서는 위생제 처리에 의해 식품에 존재하는 식중독성 미생물의 불활성화 효과를 신속하고 직접적으로 평가하는 방법을 개발하고자 하였다. 이는 위생제 처리에 의한 식중독성 미생물의 불활성화 효과를 기존의 plate count 방법으로는 많은 시간이 소요되며, 또한 균주의 특성 및 배양환경과 같은 변수 때문에 정확하게 분석하기에 어렵다는 문제점을 해결하기 위한 방안을 제시하기 위해 진행되었다. 먼저 *Salmonella*균은 계육 표면의 주로 모공 또는 표면의 주름진 틈사이에 오염되어 존재하는 것으로 확인할 수 있었다. 그리고 TSP 처리에 의한 *Salmonella*균의 불활성화 효과를 CLSM과 flow cytometry의 다색 영상화 방법을 이용하여 cell viability 염색 방법으로 평가할 수 있었다. 또한 이와 같은 방법을 이용함으로써 *Salmonella*균으로 오염된 계육에 TSP 처리하였을 때, *Salmonella*균이 계육의 오염부위에서 불활성화 되어 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 식품에 존재하는 식중독성 미생물에 대하여 다양한 위생제 처리에 의한 불활성화 효과를 cell viability 측면에서 직접적이면서 신속하고 명확하게 평가할 수 있음이 확인되었다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(03-PJ1-PG1-CH11-0003).

## 문 헌

- Dickson JS, Anderson ME. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. *J. Food Prot.* 55: 133-140 (1992)
- Marriott NG. Meat and Poultry Processing and Product Sanitation, pp. 230-264. In: Principles of Food Sanitation 3ed, Chapman and Hall, New York, USA (1994)
- Slavik MF, Kim JW, Walker JT. Reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* on chicken carcasses by changing scalding temperature. *J. Food Prot.* 58: 689-691 (1995)
- Park DL, Rua SM Jr, Acker RF. Direct application of a new hypochlorite sanitizer for reducing bacterial contamination on foods. *J. Food Prot.* 54: 960-965 (1991)
- Mosteller TM, Bishop JR. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *J. Food Prot.* 56: 34-41 (1993)
- Krysiski EP, Brown LJ, Marchisello TJ. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J. Food Prot.* 55: 246-251 (1992)
- Wang H, Slavik MF. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *J. Food Prot.* 61: 276-279 (1998)
- Gorman BM, Sofos JN, Morgan JB, Schmidt GR, Smith GC. Evaluation of hand-trimming, various sanitizing agents, and hot water spray-washing as decontamination interventions for beef brisket adipose tissue. *J. Food Prot.* 58: 899-907 (1995)
- Kim CR, Kim KH, Moon SJ, Kim YJ, Lee YK. Microbiological and physical quality of refrigerated chicken legs treated with acetic acid. *Food Sci. Biotechnol.* 7: 13-17 (1998)
- Fu AH, Sebranek JG, Murano EA. Microbial and quality characteristics of pork cuts from carcasses treated with sanitizing sprays. *J. Food Sci.* 59: 306-309 (1994)
- Tambllyn KC, Conner DE. Bactericidal activity of organic acids in combination with transdermal compounds against *Salmonella typhimurium* attached to broiler skin. *Food Microbiol.* 14: 477-484 (1997)
- Bell KY, Cutter CN, Sumner SS. Reduction of foodborne microorganisms on beef carcass tissue using acetic acid, sodium bicarbonate, and hydrogen peroxide spray washes. *Food Microbiol.* 14: 439-448 (1997)
- Muriana PM. Effect of pH and hydrogen peroxide on heat inactivation of *Salmonella* and *Listeria* in egg white. *Food Microbiol.* 14: 11-19 (1997)
- Ren TJ, Frank JF. Susceptibility of starved planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizer as determined by direct viable and agar plate counts. *J. Food Prot.* 56: 573-576 (1993)
- Cutter CN, Siragusa GR. Reductions of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* on beef following nisin spray treatments and vacuum packaging. *Food Microbiol.* 13: 23-33 (1996)
- Vignolo G, Fadda S, Kairuz MND, Holgado APDR, Oliver, G. Effects of curing additives on the control of *Listeria monocytogenes* by lactocin 705 in meat slurry. *Food Microbiol.* 15: 259-264 (1998)
- Avery SM, Buncie S. Antilisterial effects of a sorbate-nisin combination in vitro and on packaged beef at refrigeration temperature. *J. Food Prot.* 6: 1075-1080 (1997)
- Breen PJ, Salari H, Compadre CM. Elimination of *Salmonella* contamination from poultry tissue by Cetylpyridinium chloride solutions. *J. Food Prot.* 60: 1019-1021 (1997)
- Seong HS. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in poultry meat. MS thesis, Chungbuk National University, Chungju, Korea. (2001)
- Chung KT, Dickson JS, Crouse JD. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1329-1333 (1989)
- Hwang CA, Beuchat LR. Efficacy of selected chemical for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *J. Food Prot.* 58: 19-23 (1995)
- Xiong H, Li Y, Slavik MF, Walker JT. Spraying chicken skin with selected chemicals to reduce attached *Salmonella typhimurium*. *J. Food Prot.* 61: 272-275 (1998)
- Kim CR, Kim KH. Physicochemical quality and gram negative bacteria in refrigerated chicken legs treated with trisodium phosphate and acetic acid. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 218-221 (2000)
- Cho JC, Kim SJ. Viable, but non-culturable state of a green fluorescent protein-tagged environmental isolate of *Salmonella typhi* in groundwater and pond water. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 257-264 (1999)
- Marsh P, Morris NZ, Wellington EMH. Quantitative molecular detection of *Salmonella typhimurium* in soil and demonstration of persistence of an active but non-culturable population. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 351-363 (1998)
- Turner K, Porter J, Pickup R, Edwards C. Changes in viability

- and macromolecular content of long-term batch culture of *Salmonella typhimurium* measured by flow cytometry. J. Appl. Microbiol. 89: 90-99 (2000)
27. Oliver JD, Dagher M, Linden K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. J. Water Health 3: 249-257 (2005)
  28. Vodovotz Y, Vittadini E, Coupland J, McClements DJ, Chinavhoti P. Bridging the gap: use of confocal microscopy in food research. Food Technol. 50: 74-82 (1996)
  29. Kim KY, Frank JF, Craven SE. Three-dimensional visualization of *Salmonella* attachment to poultry skin using confocal scanning laser microscopy. Lett. Appl. Microbiol. 22: 280-282 (1996)
  30. Wong Liang JW, Frank JF, Baily S. Visualization of eggshell membranes and their interaction with *Salmonella enteritidis* using confocal scanning laser microscopy. J. Food Prot. 60: 1022-1028 (1997)
  31. Carter NP, Meyer EW. Chapter 1. Introduction to the principles of flow cytometry. pp. 1-28. In: Flow cytometry. Ormerod MG (ed). IRL Press, Oxford, NY, USA (1990)
  32. Weaver JL. Estimation of cell viability by flow cytometry. pp. 77-83. In: Flow cytometry protocols. Jaroszeski MJ, Heller R (eds). Human Press, NJ, USA (1998)
  33. Haugland RP. Chapter 16. Assays for cell viability, proliferation and function. pp. 365-398. In: Handbook of fluorescent probe and research chemicals, 6th ed, Spence MTZ (ed). Molecular Probes. OR, USA (1996)
  34. Jang KI, Jeong HS, Kim CH, Kim KY. Assessment of inactivation for *Campylobacter* spp. attached on chicken meat. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 33: 302-307 (2005)
  35. Chung KT, Dickson JS, Crouse JD. Attachment and proliferation of bacteria on meat. J. Food Prot. 52: 173-177 (1989)
  36. Thomas CJ, McMeekin TA. Effect of water uptake by poultry tissues on contamination by bacteria during immersion in bacterial suspensions. J. Food Prot. 47: 398-402 (1984)
  37. Lillard HS. Role of fimbriae and flagella in the attachment of *Salmonella typhimurium* to poultry skin. J. Food Sci. 51: 54-56 (1986)
  38. Dickson JS, Koohmaraie M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surface. Appl. Environ. Microbiol. 55: 832-836 (1989)
  39. Oh JS, Shin KS, Yoon YD, Park JM. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in broilers and chicken processing plants. Korean J. Food Hyg. 3: 27-36 (1988)