

아포살균용 살균소독제 유효성 평가방법 확립

김형일 · 전대훈¹ · 윤혜정² · 광인신 · 엄미옥¹ · 성준현 · 박나영¹ · 원선아¹ · 배서영 · 이영자¹ · 김소희*
식품의약품안전평가원 첨가물포장과, ¹식품의약품안전청 첨가물기준과, ²식품의약품안전평가원 화학물질과

Establishing Test Method of Sporicidal activity of Commercial Sterilants

Hyungil Kim, Daehoon Jeon¹, Haejung Yoon², Inshin Kwak, Miok Eom¹, Junhyun Sung, Nayoung Park¹,
Sunah Won¹, Seoyoung Bae, Youngja Lee¹, and Sohee Kim*

Food Additives and Packages Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,

¹Food Additive Standard Division, Korea Food and Drug Administration,

²Food Chemical Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

(Received September 11, 2009/Revised October 15, 2009/Accepted October 27, 2009)

ABSTRACT - Usually, bacterial spores are hundreds or thousands of times more resistant to chemical sanitizers than are vegetable bacteria. Consequently, it is hard to assess whether a commercial sterilant, containing hydrogen peroxide and peracetic acid as ingredients, has or does not have sporicidal activity under certain conditions using the National Standard Test Method for assessing bactericidal activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Hence we established alternative the standard test method and requirements to determine whether they are effective in showing at least reduction of 10^3 in the number of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spores under the required test condition for evaluation of sporicidal activity including verification methodology. This standardized method has proved to be suitable for evaluating effectiveness of commercial sterilants and could be used as Standardization Test Method for assessing sporicidal activity.

Key words: commercial sterilants, hydrogen peroxide, peroxyacetic acid, sporicidal activity

식품용 기구 및 용기포장에 오염된 포자형성균은 식품 제조과정 중 제거하기가 쉽지 않고 포자형태로 살아남아 식품의 부패나 식중독의 원인이 될 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 최근에는 우유팩이나 음료용 PET병 등의 위생적 관리를 위해 과산화수소나 과산화초산을 원료로 하는 살균소독제^{1,2)}가 무균충전장치(Aseptic Filling System) 등에 사용되고 있다. 특히 과산화초산은 WHO (World Health Organization)에서 formaldehyde, sodium hypochlorite, glutaraldehyde, 과산화수소와 함께 바실러스 포자에 대해 효과적인 아포살균제로 권고³⁾하고 있으며, 사용 후 산소, 물, 초산으로 분해되어 유기물질을 남기지 않아 주목받고 있는 살균소독제⁴⁾이다. 그러나, 과산화초산 등을 포자제거 목적으로 사용하는 하기 위해서는 일반적인 기구등의 살균소독제와는 사용농도 및 접촉시간 등 사용조건이 다르므로 이를 평가하기 위한 유효성 평가방법은 현재 고시된 시험방법인 현탁액시험법⁵⁾을 적용하기 어렵

다. 유럽연합의 경우, CEN (European Committee for Standardization)의 TC (Technical Committee) 216에서 개발한 아포살균용 살균소독제에 대한 유효성 평가법(Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity, CEN EN 13704)⁶⁾을 별도로 2002년 유럽 공통시험법으로 발표한 바 있고 미국의 경우에도 아포살균용 살균소독제 유효성 평가를 위한 시험법⁷⁾이 마련되어 있다. 그러나, 국내에서는 아포살균용 살균소독제의 유효성 평가방법에 대한 체계적인 연구가 미흡하여 아포살균용 살균소독제의 관리방안 마련을 위한 연구가 필요한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 미국, 유럽연합의 아포살균용 살균소독제 유효성 평가방법을 보완하여 국내실정에 맞는 아포살균용 살균소독제의 유효성 평가방법을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

시약 및 배지

모든 시약은 분석등급 이상의 시약을 사용하였으며, 보

*Correspondence to: Sohee Kim, Food Additives and packages Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 194 Tongilno, Eunpyunggu, Seoul, 122704, Korea
Tel: 82-2-380-1696, Fax: 82-2-358-0525
E-mail: soheekim@kfda.go.kr

통배지(Nutrient broth), 보통한천배지(Nutrient agar), BBL™ AK agar#2는 Becton Dickinson사(MD, USA)로부터, Tryptone soya agar는 Oxoid사(hampshire, England)로부터 각각 구입하여 사용하였다.

경수의 조제

용액 A (MgCl₂ 19.84 g과 CaCl₂ 46.24 g을 물 1에 용해) 3 ml와 용액 B (NaHCO₃ 35.02 g을 물 1에 용해) 8 ml에 증류수를 첨가하여 1l로 정용한 뒤 pore size 0.45 μm의 membrane filter로 여과 멸균하였다.

간섭물질의 조제

알부민(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) 0.3 g을 물 100 ml에 녹이고 여과 멸균하여 간섭물질로 사용하였다.

시험용액의 조제

국내 유통중인 과산화초산 함유제품 3종(Table 1 참조)을 제조업체로부터 제공 받아 경수로 희석하여 사용하였다.

포자현탁액 및 포자현탁희석액의 조제

포자현탁액 조제에 사용된 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* ATCC19659 및 *Clostridium sporogenes* ATCC 3584는 코람바이오텍(주)(서울, 한국)으로부터 구입하여 사용하였다. 포자현탁액은 Tomasino 등⁸⁾의 방법과 CEN EN 13704⁶⁾에 따라 조제하였다. 우선 상기 균주를 각각 보통배지에 접종하여 *Bacillus subtilis*의 경우 30°C ± 1°C에서 18~24시간 배양하고, *Clostridium sporogenes*의 경

우에는 GasPak™ EZ Anaerobe Container System (Becton Dickinson, MD, USA)을 사용하여 36°C ± 1°C에서 24~48 시간 혐기배양하였다. 각 배양액 2~3 ml를 황산망간첨가한천배지(Nutrient agar with 5 μg/ml MnSO₄-H₂O)에 접종하여 상기 조건에서 14일간 각각 배양하였다. 멸균유리구슬과 멸균증류수로 집균하여 10,000rpm에서 20분 ± 10초간 원심분리하고 상층액을 제거한 다음 다시 멸균증류수에 부유시켜 세척하는 과정을 3회 반복하고 최종적으로 멸균증류수에 현탁시킨 후 75°C ± 1°C에서 10분 ± 10초간 가열하였다. 위상차현미경으로 포자생성을 Fig. 1과 같이 확인하고 멸균증류수로 희석하여 포자의 수가 1.5 × 10⁶ ~ 5 × 10⁶ cfu/ml가 되도록 조제한 액을 포자현탁액으로, 포자의 수가 6 × 10² ~ 3 × 10³ cfu/ml가 되도록 조제한 액을 포자현탁희석액으로 하였다.

실험방법

아포살균용 살균소독제의 유효성 평가방법은 시험균주, 배양조건, 기구등 살균소독제의 접촉시간 및 사용온도 등 실제사용조건 등을 고려하여 CEN EN 13704⁶⁾ 및 AOAC Method 966.04⁷⁾의 방법을 수정·보완하여 수행하였다. 살균소독력 유무에 대한 기준은 각 시험용액별로 포자수 감소율이 10³이상일 때를 살균소독력이 있다고 판정하였다. 아포살균용 살균소독제의 유효성에 대한 유의성 검증은 Student's t-test로 양측검증을 시행하여 p값이 0.05이하인 때를 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

시험조작

시험관에 간섭물질 1 ml 및 포자현탁액 1 ml를 첨가하여 즉시 혼합하고 θ°C ± 1°C(θ = 4, 10, 20, 40, 75) 항온수조에서 2분 ± 10초간 방치한 후 시험용액 8 ml를 첨가하여 혼합한 다음 θ°C ± 1°C 항온수조에서 t분 ± 10초(t = 5, 15, 30, 60)간 반응시켰다. 이 반응혼합액 0.1 ml를 취하여 멸균증류수 50 ml와 함께 막여과장치(Analytical filter unit, Nalgene)로 즉시 여과하고 다시 멸균증류수 50 ml~150 ml를 가하여 세척 여과하였다. 막여과장치의 여과막을 여과한 쪽이 위로 향하게 하여 보통한천배지에 밀착시켜 *Bacillus subtilis* 포자현탁액의 경우 36°C ± 1°C에서 24시간 배양하

Table 1. Commercial sanitizers used in this study.

Sanitizer	Active ingredients(%)	Dilution ratio recommended by manufacturer
A	Peroxyacetic acid(15.0) Hydrogen peroxide(10.0)	1:75
B	Peroxyacetic acid(5.8) Hydrogen peroxide(27.5)	1:20
C	Peroxyacetic acid(4.4) Hydrogen peroxide(6.9) Octanoic acid(3.3)	1:22

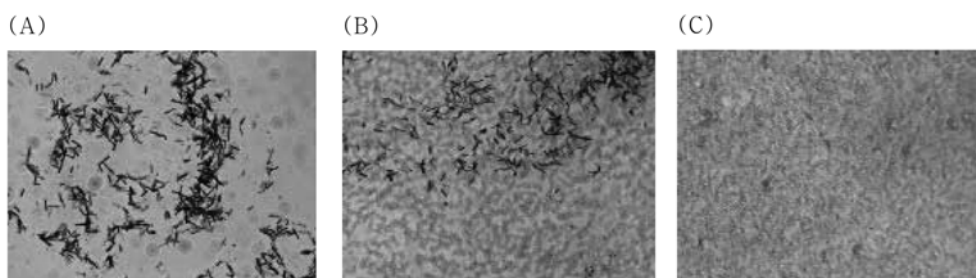


Fig. 1. Scanning phase contrast micrographs of *Bacillus subtilis* ATCC 6633. (A) Cell were grown in nutrient broth at 30°C for 3 days, (B) in nutrient agar at 30°C for 14 days, and (C) after heating at 75°C for 10 min

고, *Clostridium sporogenes*의 경우 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 혐기 배양하였다. 페트리접시에서 최대 집락수를 세고 시험용액의 살균소독 작용에 의한 포자수를 산정하였다. 따로 시험조건, 여과과정 및 여과방법에 대한 검증시험을 수행하였다.

검증시험

시험조건 검증

상기 시험방법 중 포자현탁액 대신 포자현탁희석액을, 시험용액 대신 경수를 반응혼합액 0.1 ml를 1.0 ml로 하여 시험한 결과 계수된 포자수가 포자현탁희석액 포자수의 0.05배수 이상인지를 확인하였다.

여과과정 검증

포자현탁희석액 0.1 ml를 멸균증류수 50 ml와 함께 여과장치를 통해 여과하고 멸균증류수 50 ml로 추가 세척 여과하여 상기 시험조작과 동일하게 배양한 결과 계수된 포자수가 포자현탁희석액 포자수의 0.05배수 이상인지를 확인하였다.

여과방법 검증

시험관에 간섭물질 1 ml, 멸균증류수 1 ml 및 시험용액 8 ml를 혼합하여 $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 t 분 ± 10 초간 반응시킨 후, 이 반응액 중 0.1 ml를 취하여 멸균증류수 50 ml와 함께 막여과장치로 즉시 여과하고 멸균증류수 50 ml~150 ml로 세척 여과하였다. 포자현탁희석액 0.1 ml와 멸균증류수 50 ml를 혼합하여 여과하고 멸균증류수 50 ml로 추가 세척 여과하여 상기 시험조작과 동일하게 배양한 결과 계수된 포자수가 여과과정 검증에서 산정한 포자수의 0.5

배수 이상인지를 확인하였다.

결과 및 고찰

보통 세균 포자는 화학적 살균제에 대해 영양세포보다 수백~수천배이상 저항성을 가지고 있으며, *Bacillus*속과 *Clostridium*속 포자가 살균소독제에 가장 큰 저항성을 가지고 있다고 알려져 있다^{9,10}. 본 연구에서는 유럽표준위원회(CEN)의 TC 216에서 제안한 CEN EN 13704⁹의 사용균주인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 포자와 AOAC Method 966.04⁷의 사용균주인 *Bacillus subtilis* ATCC 19659 및 *Clostridium sporogenes* ATCC 3584의 포자를 대상으로 과산화초산을 원료로 하는 아포살균용 살균소독제에 대해 유럽CEN에서 제시한 기본 조건인 20°C 에서 60분간 처리하여 유효성을 평가하였으며, 그 결과는 Table 2 및 3과 같다. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 및 *Bacillus subtilis* ATCC 19659의 포자는 살균소독제에 대한 감수성에 큰 차이를 보이지 않은 반면에 *Clostridium sporogenes* ATCC 3584의 포자는 상대적으로 감수성이 큰 것으로 나타났다. 따라서, 과산화초산을 원료로 하는 아포살균용 살균소독제에 대한 유효성 평가시 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 포자를 표준균주로 선택하였다.

CEN EN 13704 또는 AOAC 966.04에서 사용하는 포자 생성배지, 계수배지는 일반적으로 사용하는 배지가 아니므로 쉽게 구입하여 사용할 수 있는 대체배지를 검토하였다. CEN 13704에서 사용하는 Yeast extract agar (MYA), 식품공전¹¹에 항생물질 간이시험법의 아포액 조제시 사용되는 AK agar #2 및 최근 EPA의 OPP (Office of Pesticide Program)에서 soil extract nutrient agar의 대체배지로 제시한 바 있는 황산망간첨가 한천배지(Nutrient agar with 5 $\mu\text{g/ml}$

Table 2. Sporicidal effect of commercial sanitizers against *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* spores under the required test condition at 20°C for 60min.

Sanitizer	Dilution ration	Organisms		
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 3584
A	control	5.48 ± 0.01	5.31 ± 0.10	5.58 ± 0.33
	1:300	4.63 ± 0.21	4.59 ± 0.31	ND
	1:150	ND ²⁾	ND	ND
	1:75 ¹⁾	ND	ND	ND
B	control	5.39 ± 0.16	5.31 ± 0.10	5.58 ± 0.33
	1:320	4.11 ± 0.54	4.64 ± 0.05	ND
	1:160	ND	ND	ND
	1:20 ¹⁾	ND	ND	ND
C	control	5.39 ± 0.16	5.31 ± 0.10	5.58 ± 0.33
	1:243	4.51 ± 0.66	4.95 ± 0.10	ND
	1:122	ND	ND	ND
	1:22 ¹⁾	ND	ND	ND

¹⁾Dilution ration recommended by manufacturer

²⁾Not detectable by plate count method with a detection limit of $< 15 \log_{10}\text{CFU/ml}$

Table 3. Supplementary test results against *Clostridium sporogenes* ATCC 3584 spore.

Sanitizer	Dilution ratio	Exposure time(min)		
		0	5	60
A	1:1,200		4.73 ± 0.09	2.85 ± 0.49
	1:600	5.52 ± 0.08	2.73 ± 0.64	ND
	1:300		ND ¹⁾	ND
B	1:464		5.01 ± 1.17	4.86 ± 0.05
	1:232	5.23 ± 0.21	4.63 ± 0.05	ND
	1:116		0.76 ± 1.32	ND

¹⁾Not detectable by plate count method with a detection limit of < 15 log₁₀CFU/ml

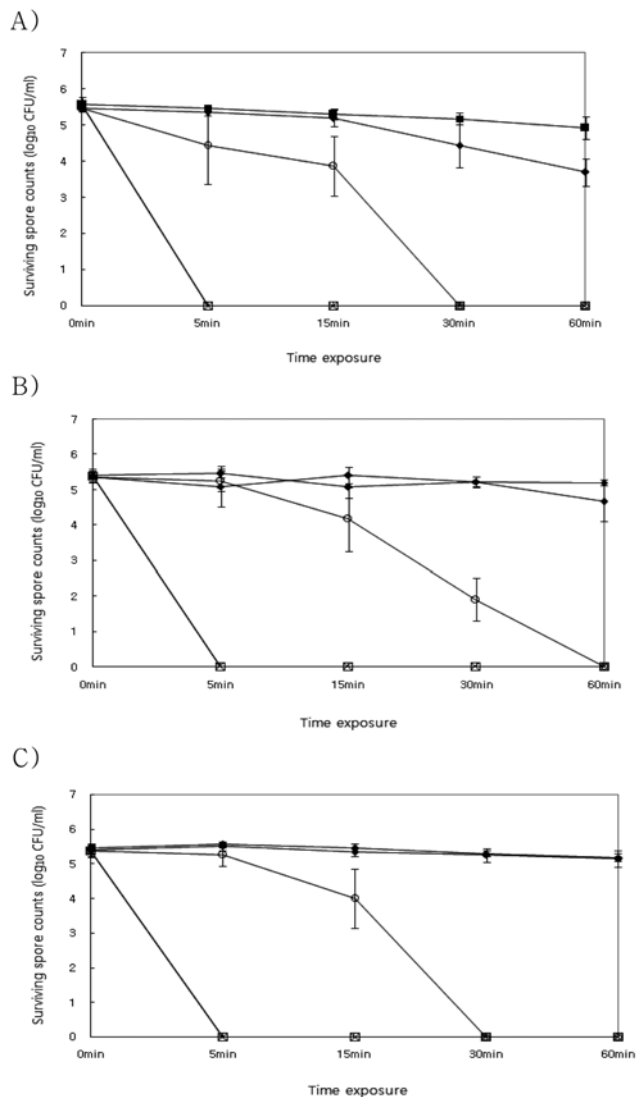


Fig. 2. Sporicidal effects of commercial sanitizers (A; dilution ratio 1:150, B; dilution ratio 1:160, C; dilution ratio 1:122) against *B. subtilis* spore in suspension test. Surviving spores are plotted as a function of exposure time and temperature (■; 4°C, ●; 10°C, ○; 20°C, □; 40°C, ×; 75°C).

MnSO₄-H₂O를 *Bacillus subtilis* 포자액 조제를 위해 사용하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis* 포자액 조제에 배지의 중

류가 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타나($p < 0.05$) 일반적으로 사용되는 보통한천배지(Nutrient agar)에 황산망간을 5 µg/ml 농도로 첨가하여 포자생성배지로 사용하였다.

Bacillus subtilis 포자수를 계수하기 위한 배지로 CEN 13704에서 사용하는 Glucose yeast extract agar (GYA)와 살균소독제의 유효성 평가시 일반적으로 사용하는 Tryptone soya agar (TSA) 및 보통한천배지를 각각 사용하고, 포자의 발아를 위한 조건도 기존의 30°C/72시간 배양과 36°C/24시간을 비교하였다. 그 결과 일반적으로 사용되는 보통한천배지에서 37°C, 24시간 배양한 결과가 다른 배양조건과 차이가 없는 것으로 나타나($p < 0.05$) 보통한천배지를 계수배지로 사용하고 37°C에서 24시간 배양 후 계수하였다.

충분히 세척되지 않은 사용조건을 모사하기 위하여 김 등¹²⁾의 방법에 따라 간섭물질로 알부민 용액을 사용하여 유기물에 의한 간섭조건을 인위적으로 설정하였다. 다만, 아포살균용 살균소독제는 일반 조리기구의 살균·소독과는 달리 주로 식품가공공장에서 우유팩이나 PET병 등의 무균충전을 위해 사용되고 있으므로 오염조건을 제외한 청정조건만을 설정하였다.

Bacillus subtilis ATCC 6633 포자를 사용하여 국내 유통중인 아포살균용 살균소독제의 처리온도 및 시간에 따른 유효성을 평가한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 유럽연합의 기준에 따라 20°C에서 60분 처리시 3제품 모두 제조사가 제시한 희석농도보다 낮은 농도에서 초기 포자수가 10³이상 감소하였으며, 접촉시간이 길수록, 처리 온도가 높을수록 포자수가 급격히 감소하였다. 유효성 평가에 사용된 3개 제품 중 살균소독제 B와 C는 미국 환경보호청(EPA)에 멸균제로서 등록된 수입제품¹³⁾이며, 이들 제품들은 AOAC Method 966.04의 시험방법 결과에 의해 사용농도를 결정했기 때문에 비교적 높은 농도에서 사용되고 있는 것으로 판단된다. Tomasino와 Hamilton의 연구결과¹⁴⁾에 따르면 초기포자수를 6.7~7.5 log₁₀ 감소시키는 사용조건에서도 AOAC Method 966.04에 따라 시험하였을 때 적합하지 않았다고 보고한 바 있다. AOAC Method 966.04는 제품의 유효성을 정성적으로 측정하는 방법으로 EPA의 등록을 위해서는 3개 lot의 제품에서 porcelain penicylinder와 silk suture loop에 건조된 *Bacillus subtilis*와 *Clostridium*

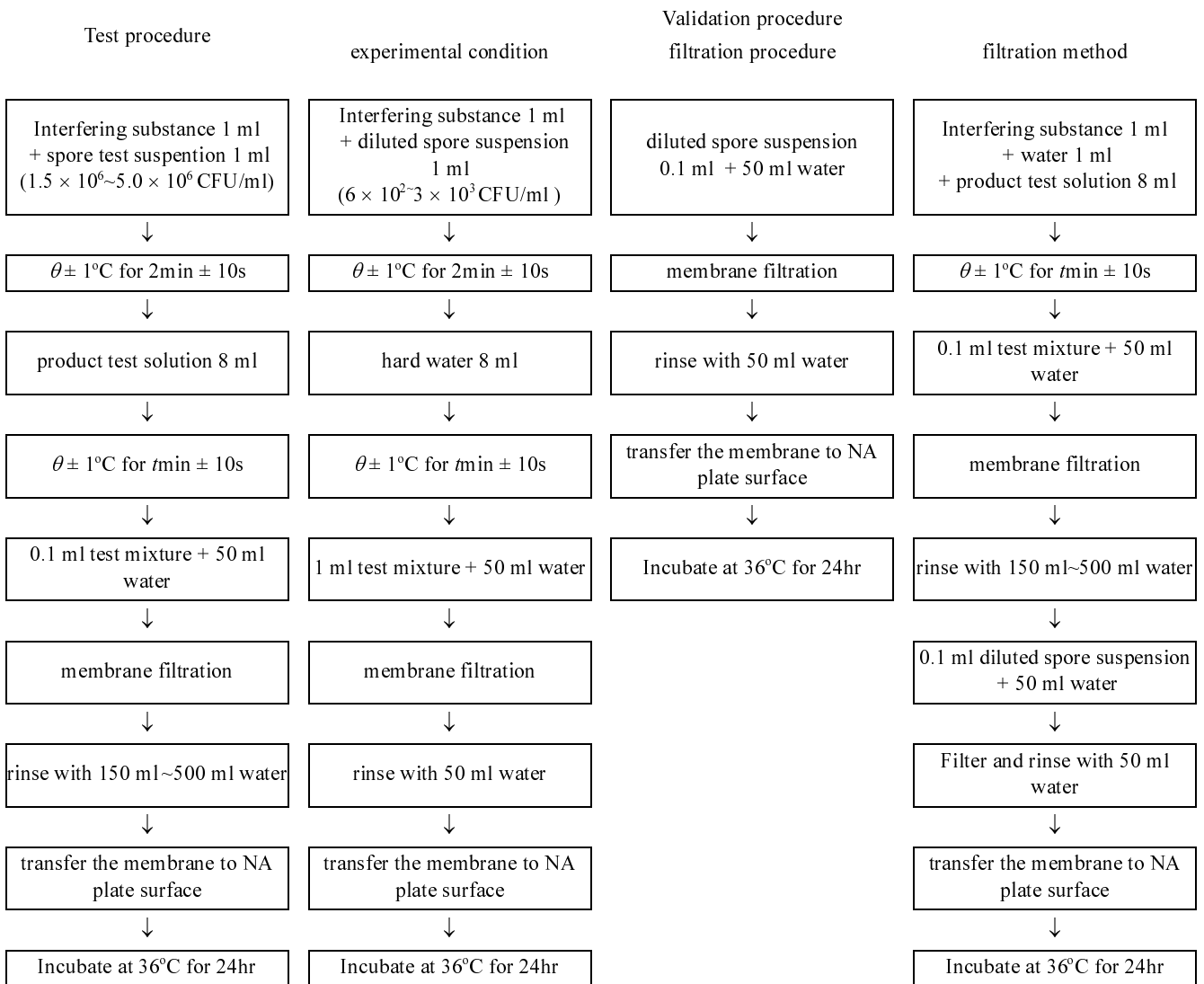


Fig. 3. Scheme of sporicidal testing method

sporogenes 포자의 어떠한 생육도 관찰되지 않아야 한다. 그러나, 이 시험방법의 신뢰도는 최근 수년간 문제가 있음이 지적¹⁵⁻¹⁸⁾되어 일부 연구자들에 의해 유효성 평가의 정량적 접근방법을 포함한 개선안들이 제안된 바 있다¹⁹⁻²²⁾. 2001년 탄저균 포자를 이용한 생물테러에 대하여 아포살균용 살균소독제로 초기 제거가 실패한 이후 Antimicrobial 관리업무를 담당하고 있는 미국 EPA의 OPP에서는 아포살균용 살균소독제의 유효성 시험방법을 재평가하고 개선시키기 위한 연구를 시작하였으며, 일부 결과를 논문과 홈페이지를 통해 제공^{8,23-25)}하고 있다. 그러나, 아직까지 실험방법의 표준화와 분석비용, 실험시간의 단축 등 해결해야 할 문제점을 안고 있다. 따라서, 실험자가 실험하기 비교적 쉽고 일반적인 기구등의 살균소독제에 대한 살균소독력시험법¹²⁾과 유사한 시험법으로 포자현탁액시험법을 Fig. 3과 같이 확립하였다. 확립된 시험법은 기존의 살균소독력시험법과 같이 시험조건 검증(살균소독제를 첨가하

지 않은 조건에서 살균력이 나타나는지를 확인), 여과과정 검증(여과 과정이 포자에 대하여 살균 또는 억제 효과가 있는지 확인) 및 여과방법 검증(시험용액, 간섭물질 등의 혼합액이 여과시 포자에 영향을 미치는지 확인)등 검증시험을 포함하였다.

감사의 말씀

본 연구는 2008년도 식품의약품안전청 연구개발사업의 연구비지원(08081식품안007)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

요 약

세균포자는 살균소독제에 대해 영양세포보다 수백~수천 배이상 저항성을 가지고 있기 때문에 과산화수소 및 과산

화초산을 원료로 하는 아포살균용 살균소독제는 *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus aureus*의 감소율을 측정하는 현행 살균소독제 유효성 평가방법을 적용하기 어렵다. 따라서, 아포살균용 살균소독제의 유효성 평가를 위해 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 포자를 표준균주로 하여 아포살균용 살균소독제를 처리했을 때 초기포자수를 10^3 이상 감소시키는지를 측정하는 정량적 표준시험방법을 확립하였다. 확립된 시험법은 아포살균력을 측정하는 국가표준시험법으로서 아포살균용 살균소독제의 유효성 평가에 적합하였다.

참고문헌

- Code of Federal Regulations. 21 Part 178.1005. Hydrogen peroxide solution. U. S. Government printing office. Washington, DC. pp. 358-359 (2007).
- Inventory of Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications. FCN No. 561 & 625. Available from <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/>. Accessed Aug. 21, 2009.
- WHO/EMC/ZDI/98/6 Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. Available from <http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/whoemczdi986text.pdf>. Accessed Aug. 21, 2009.
- Russell, H. : Principles and practice of disinfection preservation & sterilization. *Part 2: Practice 12. Sterilization*. 4th Ed. Blackwell publishing. Massachusetts, pp. 416-418 (2004).
- 식품첨가물공전 IV. 일반시험법 36. 살균소독력시험법. 식품의약품안전청, 서울, pp. 1426-1437 (2009).
- Chemical disinfectants -Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements(phase 2, step 1). *European Committee for standardization*, EN 13704, BSI, London (2002).
- Official Methods of analysis. AOAC Official Method 966.04. 17th Ed., AOAC international, Gaithersburg, pp. 22-27 (2002).
- Tomasino, S.F. and Samalot-freire L.C. : AOAC Methods 966.04: Preliminary evaluation of cooked meat medium with manganese sulfate for the cultivation of *Clostridium sporogenes*: Precollaborative study. *Journal of AOAC International*, **90**(3), 825-833 (2007).
- Coates, D. : Sporicidal activity of sodium dichloroisocyanate, peroxygen and glutaraldehyde disinfectants against *Bacillus subtilis*. *Journal of Hospital Infection*, **32**, 283-294 (1996).
- Russell, A.D. : Assessment of sporicidal efficacy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **41**, 281-287 (1998).
- 식품공전 제10. 일반시험법 5. 식품 중 잔류동물용의약품 시험법. 식품의약품안전청, 서울, pp. 10-5-2 (2009).
- 김형일, 이광호, 곽인신, 엄미옥, 전대훈, 성준현, 최정미, 강한샘, 김용수, 강길진 : 살균소독력시험법 확립 및 살균소독력 평가. 한국식품과학회지, 37(5), 838-843 (2005).
- List A: EPA's Registered Antimicrobial Products as Sterilizers. Available from http://www.epa.gov/oppad001/list_a_sterilizer.pdf. Accessed Dec. 22, 2008.
- Tomasino, S.F. and Hamilton M.A. : Comparative of two quantitative test methods for determination the efficacy of liquid sporicides and sterilants on a hard surface: A precollaborative study. *Journal of AOAC International*, **90**(2), 456-464 (2007).
- Gangi, V.J., Leonard, I.E., and Rodriguez, A.A. : Evaluation of Materials as Bacterial Spore Carriers for Testing Disinfectants. *Journal of AOAC International*, **80**(6), 1361-1367 (1997).
- Miner, N., Armstrong, M., and Carr, C.D. : Modified Quantitative Association of Official Analytical Chemists Sporicidal Test for Liquid Chemical Germicides. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(8), 3304-3307 (1997).
- Miner, N., Harris, V., and Stumph, S. : Studies of Polyester Fiber as Carrier for Microbes in a Quantitative Test Method for Disinfectants. *Journal of AOAC International*, **87**(2), 429-434 (2004).
- Danielson, J.W. : Evaluation of Microbial Loads of *Bacillus subtilis* Spores on Penicylinders. *Journal of AOAC International*, **76**(2), 355-360 (1993).
- Miner, N.A., Mulberry, G.K., Starks, A.N., Powers-prather, A., Entrup, M., Armstrong, M., and Maida, B. : Identification of possible artifacts in the Association of Official Analytical Chemists sporicidal test. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(4), 1658-1660 (1995).
- Miner, N.A., Armstrong, M., Carr C.D., Maida, B., and Schlotfeld, L. : Modified quantitative Association of Official Analytical Chemists sporicidal test for liquid chemical germicide. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(8), 3304-3307 (1997).
- Sagripani, J. and Bonifacino, A. : Comparative sporicidal effects of liquid chemical agent. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(2), 545-551 (1996).
- Sagripani, J. and Bonifacino, A. : Bacterial spore survive treatment with commercial sterilants and disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(9), 4255-4260 (1999).
- Tomasino, S.F. and Hamilton M.A. : Modification to the AOAC sporicidal activity of disinfectants test(method 966.04): Collaborative study. *Journal of AOAC International*, **89**(5), 1373-1397 (2006).
- Tomasino, S.F. and Hamilton M.A. : Comparative of two quantitative test methods for determination the efficacy of liquid sporicides and sterilants on a hard surface: A precollaborative study. *Journal of AOAC International*, **90**(2), 456-464 (2007).
- U. S. EPA : Microbiology Laboratory Antimicrobial Testing Methods & Procedures. Available from <http://www.epa.gov/oppbead1/methods/atmpa2z.htm>. Accessed Dec. 22, 2008.