

생물막 형성 *Bacillus cereus*에 대한 유기산, 에탄올 및 NaCl의 제어효과

이영덕 · 유혜림 · 박종현*
가천대학교 식품생물공학과

Biocontrol of Biofilm-forming *Bacillus cereus* by Using Organic Acid, Ethanol, and Sodium Chloride

Young-Duck Lee, Hye-Lim Yoo, and Jong-Hyun Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University

Abstract Food poisoning by *Bacillus cereus* is one of the common food-borne diseases and *B. cereus* is widely distributed in natural and commercial products owing to the strong resistance caused by biofilm or spore. The ethanol, NaCl, and organic acids of acetic acid, citric acid, and lactic acid for biocontrol of biofilm-forming *B. cereus* on glass wool were investigated. The biofilm on glass wool was observed in many developments after 48 h incubation. As the results of reduction of biofilm-forming *B. cereus* by sanitizers, reduction levels of each organic acid treatment ranged to 5-6 log CFU/g-glass wool. In case of combination treatments of 20% ethanol, 10% NaCl, and 1% of each organic acid for 1-5 min, the reduction level of biofilm-forming *B. cereus* was 7-8 log CFU/g-glass wool. Therefore, combination treatments of ethanol, NaCl, and an organic acid might effectively reduce biofilm-forming *B. cereus* in various food processes and industries.

Keywords: biofilm, *Bacillus cereus*, ethanol, NaCl, organic acid

서 론

우리 나라는 쌀 등의 곡류 식품을 주식으로 섭취하고 있으며, 최근 단체 급식 증가, 즉석 조리 식품 증가, 유기농 제품 선호 등 식생활에 전반적인 변화와 기후 변화 등의 환경 변화에 따른 토양 오염으로 인해 식중독 세균인 *Bacillus cereus* 감염에 대한 위험성이 높다. *B. cereus*의 경우, Gram 양성 세균으로서 구토 유발 독소(emetic toxin) 또는 설사 독소(diarrheal toxin) 등의 다양한 독소를 분비하여 식중독을 유발시킨다(1). 그리고, 일반적인 세균이 생존하기 어려운 조건에서도 포자를 형성하여 오랜 기간 살아남을 수 있다(2). 또한, 포자 이외에 외부 환경 스트레스를 받으면서 일시적 변화(temporary change), 적응(adaptation), 돌연변이 등을 통해 생존이 가능한 것으로 알려져 있다. 최근에는 미생물이 만들어내는 생물막(biofilm)에 의해 생균(vegetative cell)으로도 생존하기 어려운 조건에서도 생존이 가능한 것으로 알려져 있다(3).

미생물 물질 표면에 부착하여 생육하면서 polysaccharide 등의 다양한 extra-polymer들을 생산하여 자신을 보호하면서 생존하게 된다. 특히 의학 부분에서는 인공으로 삽입된 catheter 등에 생물막이 형성되어 오염 미생물의 치료를 위한 항생제 치료가 어려워 큰 문제를 유발하고 있다(4). 또한 식품 산업 분야에서는 생

산 공정에 오염된 생물막에 의해 지속적으로 식품에 오염이 유발되는 것으로 알려져 있으며, 생물막이 형성된 미생물의 경우는 기열 처리, 위생 처리 등에도 생존하면서 안전한 식품 생산에 영향을 미치고 있다(5,6).

이러한 생물막 제거를 위해 물리적 처리, 화학적 처리, 생물학적 처리 등 다양한 방법을 이용하는 연구가 진행되고 있다. 일반적으로 물리적인 처리 방법으로는 scrubber 이용, electric fields, 고압 세척, 초음파, 스팀 처리를 하며, 생물학적 처리로는 bacteriophage, depolymerase 등을 이용하는 방법이 알려져 있다(7-9). 또한 화학적 처리 방법으로는 기존에 세균의 제거에 많이 응용되던 차아염소산, 4가 암모늄염, 염소수, 전해수, 과산화수소, 알코올계 살균제 등이 보고되고 있다(10,11). 특히 최근에는 hurdle technology를 적용하여 이러한 방법들을 혼합 처리하여 보다 효과적으로 제거하는 연구가 진행되고 있다(12).

따라서 본 연구에서는 *B. cereus*의 biofilm을 glass wool에서 형성을 확인하고 젯산, 아세트산, 구연산 등의 유기산과 에탄올 및 NaCl 단독 처리를 통해 biofilm 형성 *B. cereus*에 대한 저감화 효과와 이들에 대한 혼합 처리를 통해 제어 상승 효과를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

본 연구에 사용된 *B. cereus* KCTC 1094는 한국생명공학연구원 미생물자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. *B. cereus*는 Mannitol Egg York Polymyxin Agar(MYP agar; Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)에서 순수 배양된 *B. cereus*의 집락을 Tryptic soy broth(Difco Laboratory)에 접종 후 37°C에서 12-18시

*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Seongnam, Gyeonggi 461-701, Korea
Tel: 82-31-750-5523
Fax: 82-31-750-5273
E-mail: p5062@gachon.ac.kr
Received October 10, 2012; revised October 24, 2012;
accepted October 24, 2012

간 배양한 후 실험에 사용하였다. 또한 사용된 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

유리섬유(glass wool)를 이용한 *B. cereus*의 Biofilm 형성

Glass wool을 이용한 biofilm 형성은 10³ CFU/mL의 *B. cereus*를 0.5 g의 glass wool이 포함된 100 mL tryptic soy broth에서 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그리고, biofilm 형성 *B. cereus*는 배양액에서 glass wool을 꺼내 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.9)로 두 번 세척한 후 Whatman filter paper 위에서 건조시킨 후 0.1% crystal violet으로 염색한 후 광학 현미경을 통해 확인하였다. 또한, 건조시킨 glass wool을 45 g glass bead(diameter 6 mm)를 포함한 멸균 flask에 넣고 이것에 5 mL Tris-HCl(10 mM, pH 7.4) 완충액을 넣었다. 다음 glass wool에 붙어 있던 cell들을 제거하기 위해서 10분 동안 250 rpm으로 shaking하여 1 mL Tris-HCl을 회수하고 10분 동안 원심분리(12,000×g)하였다. 그리고 회수된 균체를 멸균 식염수로 현탁하여 biofilm 형성 *B. cereus*를 분리한 후 MYP agar에 심진 회석하여 도말하고 37°C에서 24시간 배양한 후 biofilm 형성 *B. cereus*의 균수를 계수하였다.

유기산, 에탄올, NaCl을 이용한 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화

Glass wool을 이용해 biofilm이 형성된 *B. cereus*를 젖산, 아세트산, 구연산의 유기산과 에탄올 및 NaCl을 처리하여 제어 효과를 확인하였다. *B. cereus*의 biofilm이 형성된 glass wool을 젖산, 아세트산, 구연산을 각각 0.01, 0.1, 1%의 농도, 10, 20, 50% 에탄올, 5, 7, 10% NaCl을 처리하였다. 그리고 glass wool로부터 biofilm 형성 *B. cereus*를 분리한 후 심진 회석하여 MYP agar에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하고 집락을 계수하였다. 모든 실험은 2 반복 수행하였다.

혼합 처리를 통한 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어 상승 효과

젖산, 아세트산, 구연산의 유기산과 에탄올, NaCl 처리를 통해 glass wool에 존재하는 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화가 가장 효과적이었던 농도를 선택하여 혼합 처리를 통한 제어 상승 효과를 확인하고자 하였다. 위생처리제들이 biofilm 형성 *B. cereus*에 가장 효과적이었던 농도에서 각각의 유기산과 에탄올, 유기산과 NaCl, 에탄올과 NaCl, 그리고 각각의 유기산과 에탄올 및 NaCl을 혼합처리한 후 glass wool로부터 biofilm 형성 *B. cereus*를 분리한 후 MYP agar에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하고 집락을 계수하였다. 모든 실험은 2 반복 수행하였다.

결과 및 고찰

유리 섬유(glass wool)를 이용한 *B. cereus*의 biofilm 형성

*B. cereus*가 biofilm 형성을 위해 glass wool이 첨가된 TSB에 *B. cereus*를 접종하고 37°C에서 배양하면서 시간에 따라 biofilm 형성 여부를 crystal violet으로 염색한 후 광학 현미경을 사용하여 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. Glass wool에 형성된 *B. cereus*의 biofilm은 3시간부터 약 4 log CFU/g-glass wool 수준으로 부착하기 시작하여 48시간 이후에는 10 log CFU/g-glass wool 수준의 biofilm이 형성되는 것으로 나타났다. 이는 Karunakaran 등, Oosthuizen 등이 glass wool을 넣어 biofilm을 만드는데 사용된 배지는 다르지만 형성 정도는 유사하였다(13,14). 최근 들어 biofilm에 대한 다양한 연구 방법이 개발되고 있으며, 대표적으로는 microplate, silicon tubing, glass wool, 동물모델 등 다양한 방법이 이용되고 있다(15-18). 특히 glass wool의 경우 biofilm 형성 세균의 분리가 편리하고 biofilm 형성을 확인하는데 매우 용이하며, 또한 부유 세균(planktonic cell)과의 분별이 쉬워 각각의 특성을 확인하는데 좋은 모델로 알려져 있다.

유기산, 에탄올, NaCl을 이용한 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화

젖산, 아세트산, 구연산 등의 유기산과 에탄올, NaCl을 각각 사용하여 glass wool에 biofilm을 형성한 *B. cereus*의 제어 효과를 분석하였다. 에탄올의 경우 10, 20, 50%의 농도로 30분 동안 처리한 결과, 초기 8 log CFU/g-glass wool에서 50% 에탄올을 30분 처리한 후 5 log CFU/g-glass wool 수준으로 감소하여, 농도가 높아짐에 따라 glass wool에 존재하는 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 에탄올의 경우 식품 중에 존재하는 여러 미생물들을 제어하는데 활용되어 왔으며, 현재도 biofilm 제어 등 다양한 분야에 응용되고 있다. 이러한 에탄올의 경우, 세균의 peptidoglycan bridge의 조합을 저해하여 사멸시키는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 biofilm의 경우 지질, 탄수화물, 단백질, 핵산 등의 다양한 extrapolymer의 복잡한 형태로 구성되어 있는데, 유기 용매인 에탄올이 biofilm에 존재하는 다양한 polymer를 일부 용해시키면서, biofilm에 존재하는 *B. cereus*를 일부 사멸시키는 것으로 사료된다(19). 또한 Kubota 등, Balestrino 등, Presterl 등, Nett 등은 여러 농도에서 알코올계 살균제들을 사용해서 biofilm의 제어 효과에 대한 연구한 결과 저농도에 비해 50% 이상의 고농도에서 보다 효과적인 것을 확인하였다(20-23).

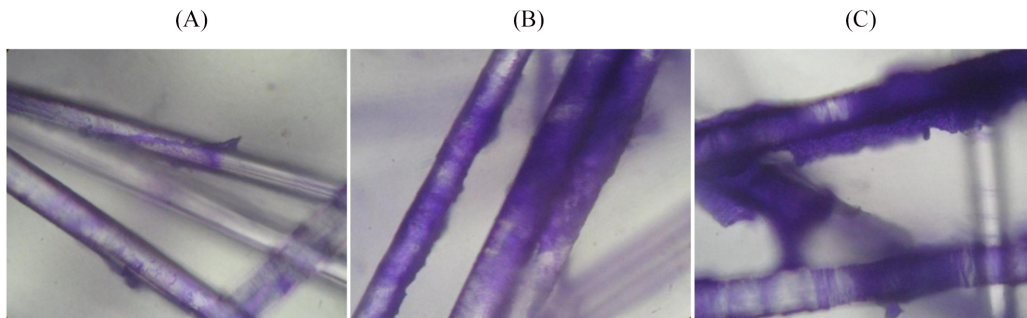


Fig. 1. Biofilm formation of *B. cereus* on glass wool by light microscopy (×1,000). (A) 3 h incubation, (B) 24 h incubation, (C) 48 h incubation

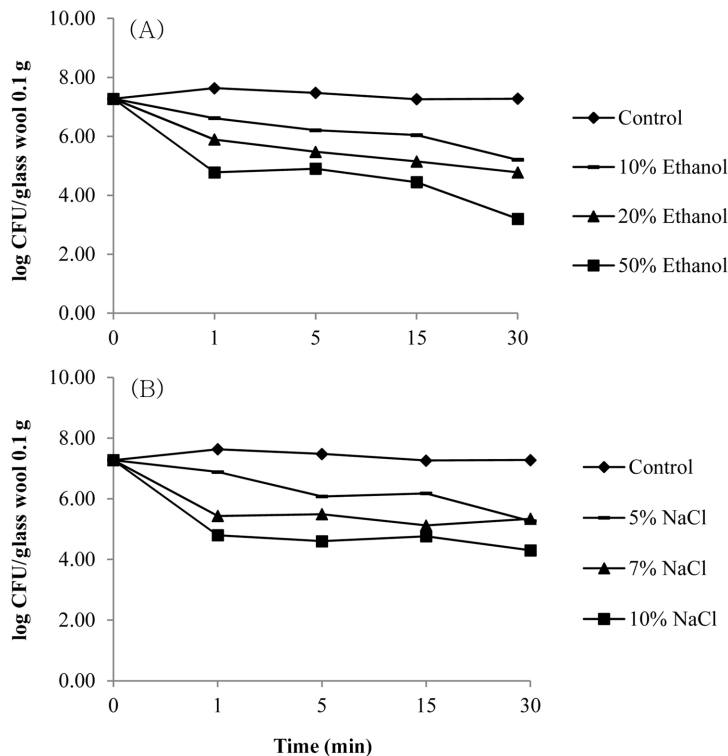


Fig. 2. Reduction of biofilm-forming *B. cereus* by (A) ethanol and (B) NaCl.

NaCl을 이용한 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어 효과를 확인한 결과, 10% NaCl을 30분 동안 처리했을 때 약 3 log CFU/g-glass wool 수준 정도만 감소되었다(Fig. 2). 일반적으로 NaCl은 hyperosmotic pressure 조건에서 미생물의 수분 함량을 낮춰서 biofilm에 있는 미생물을 불활성화 시키는 것으로 알려져 있다(24). 그러나 저농도의 NaCl(<4-5%)의 경우 오히려 biofilm의 형성을 조절한다는 연구 보고도 있으므로 고농도의 NaCl 처리가 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화에 용이할 것으로 사료된다(25-27).

젖산, 아세트산, 구연산의 유기산을 0.01, 0.1, 1%의 농도로 처리를 한 후 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화 효과를 확인하였다. 젖산과 아세트산을 0.01% 농도로 각각 처리한 경우 효과가 없었으나, 구연산의 경우 약 3 log CFU/g-glass wool로 감소하였다. 그리고, 대체적으로 0.1% 유기산으로 30분 동안 처리하여 4 log CFU/g-glass wool 수준으로 감소하는 효과를 확인하였고, 1% 유기산의 경우 각각 1분 처리 후 3-4 log CFU/g-glass wool로 감소하여 30분 이후에는 약 6 log CFU/g-glass wool로 감소하여 biofilm 형성 *B. cereus*에 제어를 위해 1% 유기산 처리가 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 3). 젖산, 아세트산, 구연산 등의 유기산은 일반적으로 generally recognized as safe(GRAS)로서 다양한 식품 분야, 의학 분야, 화장품 산업, 기타 산업 등에서 광범위하게 사용되고 있다. 특히 식품 안전을 위한 위생처리제로도 사용되고 있으며, 이는 비해리된 유기산이 이온화되면서 세포내 pH를 변화시키거나 세포막의 투과도에 영향을 미쳐 기질 이동을 방해하거나 전자 전달 체계에 문제를 야기하여 미생물을 사멸시킨다(19). Arias-Moliz 등은 젖산을 이용해 biofilm 형성 enterococci에 대한 제거 효과를 연구한 결과, 고농도(10-20%) 젖산으로 1분 동안 처리했을 때 완전히 제거가 가능하다고 보고하였으며(28), Ban 등(7)은 단독으로 2% 젖산 처리를 통해 약 1-2 log CFU/coupon 효과적으로 제어가 가능했다고 보고하였다(7). 또한, 아세트산의

경우 항미생물제로 피부에 세균성 감염 질환에 치료에 사용되기도 하며, Akiyama 등은 아세트산을 이용해 *Staphylococcus aureus*의 biofilm 형성 영향을 확인한 결과, 2.5% 아세트산에서 *S. aureus*의 biofilm이 제거되어 효과적인 것을 확인하였다(29,30). 그리고, 구연산의 경우 일반적으로 식품의 보존제 또는 감미제로 많이 사용되고 있으며, Tsai 등은 polyvinyl chloride(PVC) 표면에 오염된 biofilm 형성된 대장균을 구연산을 이용하여 99.95% 제거가 가능하다고 보고하였다(31). 따라서 본 연구에서 사용한 젖산, 아세트산, 구연산을 1% 농도로 30분 처리하였을 때 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

혼합처리를 통한 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어 상승 효과

에탄올, NaCl, 젖산, 아세트산, 구연산을 단독으로 처리하여 glass wool에서 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어가 가능한 농도를 사용해 혼합 처리하여 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어 상승 효과를 확인하고자 하였다(Fig. 4). 20% 에탄올과 10% NaCl 혼합액, 20% 에탄올과 각각의 1% 유기산 혼합액을 처리했을 경우, 5-6 log CFU/g-glass wool 수준이 감소하여, 20% 에탄올을 단독으로 처리했을 경우 약 3 log CFU/g-glass wool 감소했던 것에 비해 우수한 저감화 효과를 나타냈다. 그리고, 20% 에탄올과 10% NaCl 그리고 1% 젖산, 아세트산, 구연산을 각각 혼합하여 처리했을 경우 1-5분 이후부터 biofilm 형성 *B. cereus*가 약 2 log CFU/g-glass wool 수준만이 확인되어 짧은 시간 동안 혼합 처리를 통해 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어에 가장 효과적이었던 것으로 확인되었다(Fig. 5). 최근 biofilm 형성 세균에 대한 제어를 위해 다양한 방법이 시도되고 있으며, 특히 hurdle technique을 이용하여 다양한 위생 처리를 통해 제어하는 방법이 시도되고 있다(12,32). 예를 들면, 화학적 위생처리제 등의 복합 처리, 화학적 위생처리와 물리적 위생 처리를 통한 제어, 화학적 위생처리와 생물학적

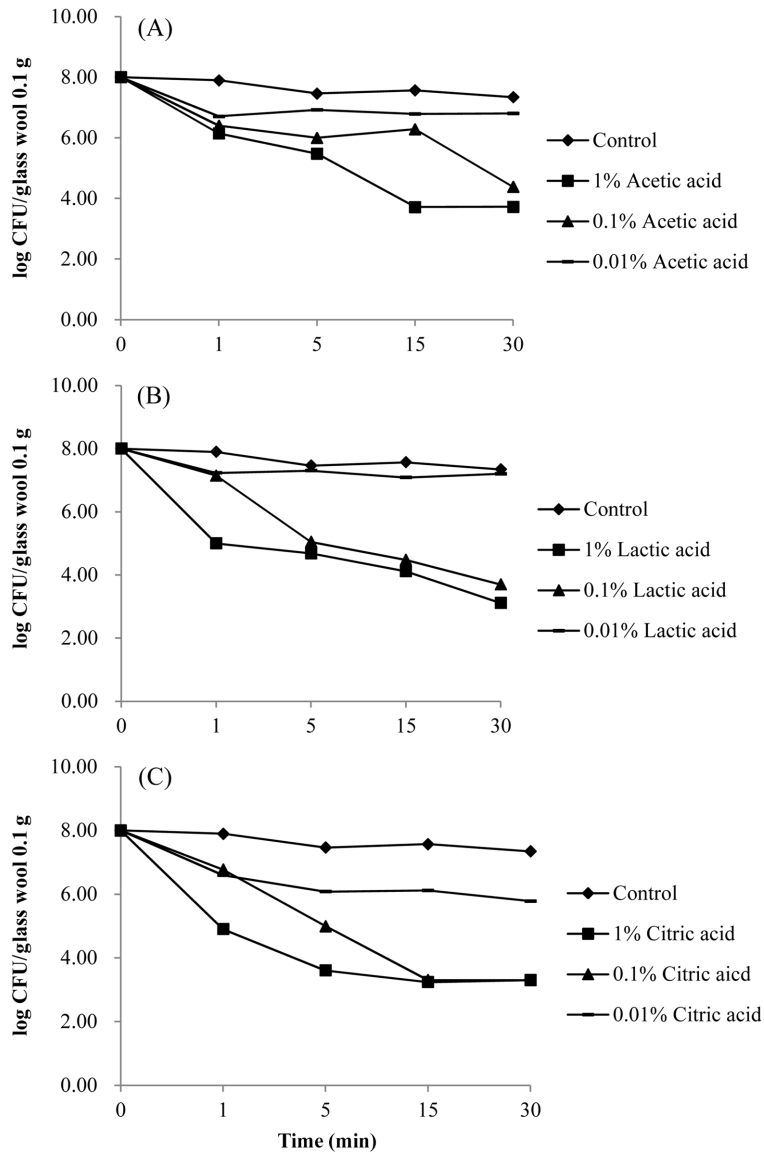


Fig. 3. Reduction of biofilm-forming *B. cereus* by organic acid. (A) Acetic acid, (B) lactic acid, (C) citric acid.

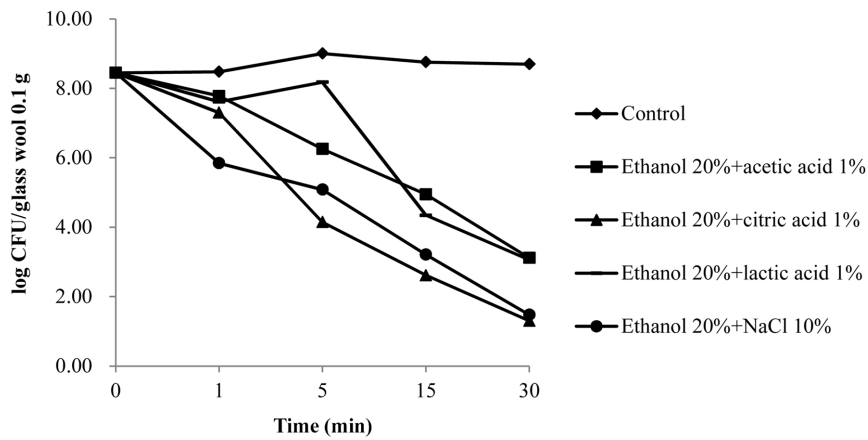


Fig. 4. Reduction of biofilm-forming *B. cereus* by ethanol with organic acid and NaCl

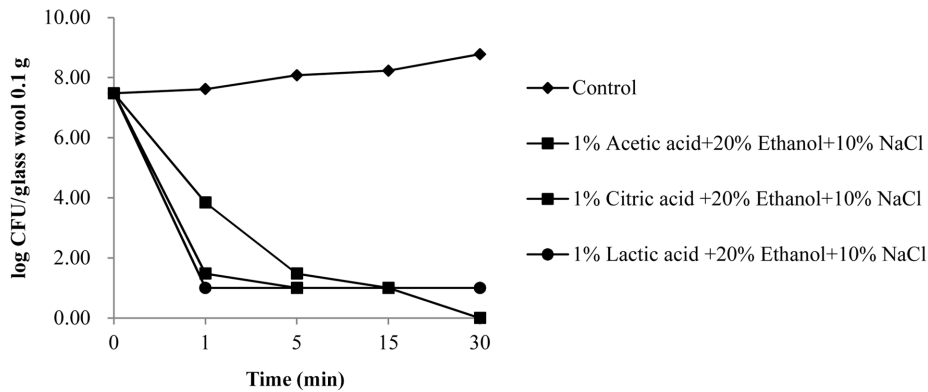


Fig. 5. Synergistic effect of organic acid/ethanol/NaCl combination to biofilm-forming *B. cereus*.

처리를 통한 biofilm 저감화 등이 시도되고 있으며, 효과 또한 단독 처리보다 우수한 것으로 나타났다. 따라서 식품 산업에서 안전한 식품 생산에 문제가 큰 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어를 위해, 본 연구를 통해 확인된 젖산, 아세트산, 구연산 등의 유기산과 에탄올 및 NaCl의 복합 처리가 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화를 위한 응용에 효과적일 것으로 판단된다. 또한 이러한 biofilm 제거법을 식품의 생산 라인 등에 적용하여 보다 안전한 식품 생산을 도모할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

유리섬유를 이용하여 *B. cereus*의 biofilm 형성 조건을 확인한 결과 3시간 이후부터 부착하여 48시간에 biofilm이 많이 형성된 것을 확인하였다. 그리고 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어를 위해 에탄올, NaCl, 유기산을 각각 단독으로 처리하였을 때 1% 젖산, 아세트산, 구연산을 30분 처리하였을 때 약 5-6 log CFU/g-glass wool 수준 감소하여 가장 좋은 효과를 나타냈다. 또한, 20% 에탄올과 각각의 1% 유기산, 20% 에탄올과 10% NaCl의 두 가지를 혼합 처리의 경우 단독으로 처리했을 때보다 저감화 효과가 우수했으며, 20% 에탄올과 10% NaCl 및 각각의 1% 유기산을 1-5분 동안 혼합 처리 했을 때 약 7-8 log CFU/g-glass wool 수준이 감소하여 biofilm 형성 *B. cereus*의 제어에 가장 효과적이었다. 따라서 본 연구 결과를 통해 유기산, 에탄올, NaCl 복합 처리 방법을 사용하여 biofilm 형성 *B. cereus*의 저감화를 효과적으로 할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 15차 Agenda project(PJ0073872010)의 2012년도 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Granum PE. *Bacillus cereus* and its toxins. J. Appl. Microbiol. 76: 61S-66S (1994)
- Wijman JG, De Leeuw PP, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. Appl. Environ. Microb. 73: 1481-1488 (2007)
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41: 435-664 (1987)
- Nickel JC, Costerton JW, McLean RJ, Olson M. Bacterial biofilms: Influence on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of urinary tract infections. J. Antimicrob. Chemoth. 33: 31-41 (1994)
- Srinivasan R, Stewart PS, Griebel T, Chen CI, Xu X. Biofilm parameters influencing biocide efficacy. Biotechnol. Bioeng. 20: 553-560 (1995)
- Abushelaibi AA, Al Shamsi MS, Afifi HS. Use of antimicrobial agents in food processing systems. Recent Pat. Food Nutr. Agric. 1: 2-7 (2012)
- Ban GH, Park SH, Kim SO, Ryu S, Kang DH. Synergistic effect of steam and lactic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. Int. J. Food Microbiol. 157: 218-223 (2012)
- Meyer B. Approaches to prevention, removal, and killing of biofilms. Int. Biodeter. Biodegr. 51: 249-253 (2003)
- Gibson H, Taylor JH, Hall KE, Holah JT. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. J. Appl. Microbiol. 87: 41-48 (1999)
- Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 12: 1-6 (2004)
- Musk DJ, Hergenrother PJ. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. Curr. Med. Chem. 13: 2163-77 (2006)
- Leistner L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int. J. Food Microbiol. 55: 181-186 (2000)
- Oosthuizen MC, Steyn B, Lindsay D, Brzel VS, von Holy A. Novel method for the proteomic investigation of a dairy-associated *Bacillus cereus* biofilm. FEMS Microbiol. Lett. 1: 47-51 (2001)
- Karunakaran E, Biggs CA. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: An investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. Appl. Microbiol. Biot. 89: 1161-1175 (2011)
- Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl. Environ. Microb. 68: 2950-2958 (2002)
- Sauer K, Camper AK. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. J. Bacteriol. 183: 6579-6589 (2001)
- Williams DL, Costerton JW. Using biofilms as initial inocula in animal models of biofilm-related infections. J. Biomed. Mater. Res. B 100: 1163-1169 (2012)
- Coenye T, Nelis HJ. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. J. Microbiol. Meth. 83: 89-105 (2010)
- Jung DH. Control of Food-borne Microorganism. Daekwang Book, Seoul, Korea. pp. 296-304 (2001)
- Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. J. Biosci. Bioeng. 106: 381-386 (2010)
- Balestrino D, Souweine B, Charbonnel N, Lautrette A, Aumeran C, Traor O, Forestier C. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution. Neph-

- rol. Dial. Transpl. 24: 3204-3209 (2009)
22. Presterl E, Suchomel M, Eder M, Reichmann S, Lassnigg A, Graninger W, Rotter M. Effects of alcohols, povidone-iodine, and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemoth. 60: 417-420 (2007)
 23. Nett JE, Guite KM, Ringeisen A, Holoyda KA, Andes DR. Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemoth. 52: 3411-3413 (2008)
 24. Wijnker JJ, Koop G, Lipman LJ. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. Food Microbiol. 23: 657-662 (2006)
 25. Xu H, Zou Y, Lee HY, Ahn J. Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. J. Food Sci. 75: M580-M585 (2010)
 26. van der Waal SV, Jiang LM, de Soet JJ, van der Sluis LW, Wesseling PR, Crielaard W. Sodium chloride and potassium sorbate: A synergistic combination against *Enterococcus faecalis* biofilms: An *in vitro* study. Eur. J. Oral Sci. 120: 452-457 (2012)
 27. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 186: 722-729 (2004)
 28. Arias-Moliz MT, Baca P, Ordez-Becerra S, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal. 1: e902-e906 (2012)
 29. Hansson C, Faergemann J. The effect of antiseptic solutions on microorganisms in venous leg ulcers. Acta Derm.-Venereol. 75: 31-33 (1995)
 30. Akiyama H, Yamasaki O, Tada J, Arata J. Effects of acetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus*. Arch. Dermatol. Res. 291: 570-573 (1999)
 31. Tsai YP, Pai TY, Hsin JY, Wan TJ. Biofilm bacteria inactivation by citric acid and resuspension evaluations for drinking water production systems. Water Sci. Technol. 48: 463-472 (2003)
 32. Barbosa-Canovas GV, Pothakamury UR, Palou E, Swanson BG. Nonthermal Preservation of Foods. Marcel Dekker, New York, NY, USA. p. 276 (1998)