

Short Communication

MPN-PCR 방법을 이용한 *Vibrio vulnificus* 균수 정량분석

장유미 · 박슬기 · 정희진 · 이장원 · 윤요한¹ · 박권삼² · 신일식³ · 김영목*

부경대학교 식품공학과, ¹숙명여자대학교 식품영양학과,
²군산대학교 식품생명공학과, ³강릉원주대학교 해양식품공학과

Quantitative Cell Count of *Vibrio vulnificus* Cells Based on MPN-PCR Method

Yu-Mi Jang, Seul-Ki Park, Hee-Jin Jeong, Jang-Won Lee, Yohan Yoon¹,
Kwon-Sam Park², Il-Shik Shin³, and Young-Mog Kim*

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan, Korea

³Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Korea

(Received September 6, 2018/Revised September 13, 2018/Accepted September 17, 2018)

ABSTRACT - The objective of this study was to establish a quantitative count method of *Vibrio vulnificus* cells. Plate count method is often used to count the number of *V. vulnificus* cells using thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar plate. However, this method is unsuitable for counting *V. vulnificus* cells due to growth inhibition and cell injuries in TCBS medium. In this study, we suggested a most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR) method using alkaline peptone water medium for the quantification of *V. vulnificus*. This MPN-PCR method showed 2 log higher cell number than TCBS agar plate method. Similar results were also found in the control using Luria-Bertani agar containing 2% NaCl. Thus, this MPN-PCR method can be used a sensitive method for quantitative count of viable *V. vulnificus* cells in fish and shellfish samples.

Key words : Injured cell, MPN-PCR, Quantitative cell count, *Vibrio vulnificus*

*Vibrio vulnificus*는 전 세계적으로 수인성 및 식품을 매개로 패혈증을 발생시키며 사람뿐만 아니라 해수 및 어패류의 육 등에서 분리가 가능하다. 2012년에서부터 2017년까지의 국내 비브리오 패혈증 환자 발병 현황에 따르면, 매년 6월~10월경에 주로 발생하고 해수의 수온이 높아지면서 발병자수가 늘어나며 9월에 가장 많이 발생한다^(1,2). 2012년에서부터 2017년의 최근 6년간 321명의 비브리오 패혈증 환자가 발생하였고 이 중 156명이 사망하여 48.6%의 높은 치사율이 보고되었다⁽¹⁾. 비브리오 패혈증은 주로 *V. vulnificus*에 오염된 어패류를 가열조리 없이 섭취하거나 피부 상처 부위를 통한 감염에 의해 발생하며 일반적으로 구토, 설사, 복통 등의 증상이 발생한다. 하지만, 간질환과 당뇨병 등의 만성질환자, 장기 이식환자 및 면역결핍환자의 경우 패혈성 쇼크에 의해 약 50%의 높은 치

사율을 일으키기 때문에 증상 발증 시 신속한 확인과 조치가 필요하다⁽¹⁻³⁾. *V. vulnificus*는 일반적으로 수온, 염도 및 pH 등의 환경 요인에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다⁽⁴⁻⁹⁾. 수온의 경우 9°C에서 31°C 사이의 온도에서 생육 가능하고 18°C 이상일 때 최적으로 증식하며^(4,5), 5%에서 35% 사이의 염도에서 생육이 가능하고 25%의 염도에서도 증식 한다⁽⁶⁻⁸⁾. 또한, pH 5~10의 조건에서 생육이 가능하며 pH 7.8이 최적 조건으로 알려져 있다⁽⁹⁾.

현재 해수 및 식품에서 *Vibrio* spp.을 분석하는데 사용하는 방법으로는 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar를 이용한 방법과 목적 유전자를 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하는 방법 등이 사용되고 있다⁽¹⁰⁾. 하지만, TCBS는 *Vibrio* spp.의 선택적 분리배양에 사용되는 선택배지로 균수 정량 실험의 경우에는 적합하지 않다는 보고가 많다^(11,12). PCR을 이용한 목적 균의 검출 및 정량의 경우는 단순히 시료 중에 존재하는 목적 DNA(사균의 DNA 포함)를 증폭하여 생균수 정량에 적합하지 않다고 보고되고 있다⁽¹³⁾. 이러한 단점들을 보완하기 위하여 alkaline

*Correspondence to: Young-Mog Kim, Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, 45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan 48547, Korea
Tel: 82-51-629-5832, E-mail: ymkim@pknu.ac.kr

peptone water (APW)에 증균 배양 후에 선택적 primer로 목적 유전자를 증폭하는 most probable number method-polymerase chain reaction (MPN-PCR) 방법이 *Vibrio* spp. 균수 정량에 사용되고 있다^{14,15}. 또한, *V. vulnificus*는 염, pH 그리고 온도 등의 환경인자 변화에 취약하여^{4,9}, TCBS를 이용한 균수 측정법으로는 정확한 균수 정량에 어려움이 있다고 보고되고 있다^{11,12,16}. 이에 본 연구에서는 심각한 식중독 감염 사고를 발생시키는 세균인 *V. vulnificus*의 보다 정확한 균수 정량분석법을 확립하기 위하여 배양 배지와 희석수 등의 변수에 따른 *V. vulnificus* 균수 변화를 분석하였다.

Materials and Methods

균주 및 배양 조건

본 연구에서 사용한 균주는 한국미생물자원센터[Korea Collection for Type Cultures (KCTC), Daejeon, Korea]에서 분양받은 *V. vulnificus* KCTC 41665 균주를 사용하였으며, 2% NaCl이 첨가된 Luria-Bertani broth (LB; Difco, Detroit, MI)에 접종하여 35°C에서 12시간 동안 배양 후 사용하였다.

일반균수측정법으로 진행한 *V. vulnificus* 균수 측정에는 LB-Na agar와 TCBS (Difco, Detroit, MI; pH 8.6 ± 0.2) agar가 사용되었고, 최확수법(MPN)에 따른 *V. vulnificus* 증균에는 APW (pH 8.4 ± 0.2)가 사용되었다.

증류수에 노출된 *V. vulnificus* 균수 측정에 대한 배지의 영향

*V. vulnificus*를 증류수에 처리하여 배지별로 균수 변화를 측정하였다. 100 mL 증류수에 1 mL의 *V. vulnificus* 배양액(약 10⁹ CFU/mL)을 현탁하고 25°C에서 10분간 처리하였다. 처리된 현탁액을 LB-Na agar와 TCBS agar에 도말하여 균수를 측정하였다. 또한, MPN-PCR 방법을 이용한 *V. vulnificus* 균수 측정은 단계별로 희석된 APW를 35°C에서 12 ± 2시간 증균 배양한 후 PCR을 통해 *V. vulnificus* 양성 band를 확인하여 MPN 표로 균수를 측정하였다. PCR

에 사용된 *V. vulnificus* 분석용 primer와 PCR 조건은 Han and Ge (2015)의 보고에 따라 수행되었으며¹⁷, *V. vulnificus*의 특이 primer (sense 5'-CAGCCGGACGTCGTCATTTTG-3'; antisense 5'-ATGAGTAAGCGTCCGACGCG T-3')를 사용하였다. 또한 94°C에서 5분간 열 변성(denaturation) 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초간 순환반응(annealing)을 25 회 실시하고, 최종적으로 72°C에서 10분간 신장반응(elongation)을 수행하였다.

V. vulnificus 균수 측정에 대한 희석수의 영향

*V. vulnificus*의 균수 분석에 미치는 희석수의 영향은 다음과 같은 방법에 따라 진행하였다. *V. vulnificus*가 약 10⁷ CFU/mL 되도록 현탁된 해수 시료 1 mL를 9 mL의 0.1 M phosphate buffer saline buffer (PBS, pH 7.0)와 2% NaCl이 첨가된 PBS(이하 PBS-Na)에 각각 희석하였다. 각 단계별 희석용액은 LB-Na agar 및 TCBS agar를 이용하여 평판도말법으로 35°C에서 12 ± 2시간 배양 후 생성된 집락수를 계수하였다. 또한, 위에서 기술한 MPN-PCR 방법으로 *V. vulnificus* 균수를 측정하였다.

통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 결과는 3회 반복하였으며, 그 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 3회에 걸쳐 시행된 실험 결과들의 유의성 검정을 위하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 행하였고 SPSS (v.23.0, SPSS Inc., Chicago, USA) 통계프로그램을 이용하여 통계 분석을 실시하였다.

Results and Discussion

Vibrio spp. 균의 생존과 증식에 염이 필요하며 염의 농도가 낮을 경우 세포가 손상된다고 보고되고 있다^{16,18}. 이에 본 연구에서는 증류수에 *V. vulnificus*를 노출시킨 후 배지에 따른 균수변화를 분석하였다(Table 1). 증류수에 10분간 처리된 *V. vulnificus*는 처리하지 않은 대조구와 비교

Table 1. Effect of culture medium on cell count of *Vibrio vulnificus* by the treatment of distilled water

| Viable cells count | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Treatment with PBS | | Treatment with distilled water | |
| LB-Na ¹⁾ | LB-Na | TCBS ²⁾ | MPN-PCR ³⁾ |
| 6.59 ± 0.34 ^a | 2.25 ± 0.56 ^b | 0.13 ± 0.23 ^b | 4.49 ± 0.96 ^d |
| (log CFU/mL) | (log CFU/mL) | (log CFU/mL) | (log MPN/100 mL) |

One mL of *V. vulnificus* cells (about 10⁹ CFU/mL) were suspended into 100 mL of distilled water and kept for 10 min at 25°C. Control was treated with 50 mL of 0.1 M phosphate buffer saline buffer (PBS, pH 7.0) containing 2% NaCl. ¹⁾LB-Na, Luria-Bertani broth containing 2% NaCl; ²⁾TCBS, thiosulfate citrate bile salts sucrose medium; ³⁾MPN-PCR, Bacterial cells were cultivated using alkaline peptone water for 12 ± 2 h at 35°C and the viable cell numbers were counted using most probable number method combined with PCR amplification. ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of dilution buffer and culture medium on cell count of *Vibrio vulnificus*

| | Combination of dilution buffer and culture medium | | | | | |
|--------------------|---|--|--|--|--|--|
| | PBS ¹⁾ / LB-Na ²⁾ | PBS/TCBS ³⁾ | PBS/ MPN-PCR ⁴⁾ | PBS-Na ⁵⁾ / LB-Na | PBS-Na/ TCBS | PBS-Na/ MPN-PCR |
| Viable cells count | 7.06 ± 0.44 ^a (log CFU/mL) | 3.74 ± 0.79 ^b (log CFU/mL) | 7.69 ± 1.13 ^c (log MPN/100 mL) | 7.88 ± 0.05 ^a (log CFU/mL) | 5.42 ± 0.18 ^c (log CFU/mL) | 9.07 ± 0.26 ^a (log MPN/100 mL) |

One mL of *V. vulnificus* cells (about 10⁹ CFU/mL) were suspended into 9 mL of 0.1 M phosphate buffer saline buffer (PBS, pH 7.0). ¹⁾PBS, phosphate buffer saline; ²⁾LB-Na, Luria-Bertani broth containing 2% NaCl; ³⁾TCBS, thiosulfate citrate bile salts sucrose medium; ⁴⁾MPN-PCR, Bacterial cells were cultivated using alkaline peptone water for 12 ± 2 h at 35°C and the viable cell numbers were counted using most probable number method combined with PCR amplification; ⁵⁾PBS-Na, phosphate buffer saline containing 2% NaCl. ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

하였을 때 균수의 감소가 나타났다. 이는 다른 연구자들의 보고와 마찬가지로 염이 없는 조건에서 *V. vulnificus* 세포가 손상되어 사멸되기 때문으로 판단된다¹⁸⁾. 하지만, 배지별로 균수의 차이가 관찰되었다. LB-Na agar 및 TCBS agar에서는 각각 2.25 ± 0.56 및 0.13 ± 0.23 log CFU/mL의 균수가 측정되었으나, APW를 이용한 MPN-PCR의 경우 4.49 ± 0.96 log MPN/100 mL로 TCBS agar와 비교하였을 때 mL 당 2 log 이상 높은 균수가 측정되었다. 이러한 결과는 증류수 처리 후에 일부의 *V. vulnificus* 세포는 사멸 상태가 아니라 손상된 상태로 존재하며 손상된 *V. vulnificus* 세포는 선택성이 강한 TCBS에서 증식이 잘 되지 않지만 APW를 이용한 MPN-PCR의 경우 증균 배양에 의해 손상된 세포가 회복되기 때문에 LB-Na agar와 비슷한 균수가 측정된 것으로 생각된다^{16,18)}. 다른 연구자들도 손상된 *Vibrio* spp.의 경우 TCBS agar 등의 선택배지에서 증식이 잘 되지 않는다는 연구 결과를 보고하고 있다^{11,12,16,18)}.

이상의 결과는 TCBS agar와 같은 선택배지는 균수 정량 분석용 배지로는 적합하지 않고 APW를 이용한 MPN-PCR 방법이 손상된 *V. vulnificus* 균수 정량에도 유용하게 적용될 수 있다는 것을 제시하고 있다^{16,18)}. 또한, 다양한 균들이 오염되어 있는 어패류 등의 시료에서 *V. vulnificus* 균수 정량분석에 MPN-PCR 방법이 유용하게 적용될 수 있다는 것을 의미한다. 이에 본 연구에서는 어패류 등의 시료에서 MPN-PCR을 이용한 *V. vulnificus* 균수 정량분석법을 개발하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 희석수의 영향에 대해 조사하였다(Table 2). *V. vulnificus* 균수 측정에 PBS를 희석수로 사용하였을 때, LB-Na 및 TCBS에서 각각 7.06 ± 0.44 및 3.74 ± 0.79 log CFU/mL의 균수가 측정되었다. 반면, APW를 이용한 MPN-PCR의 경우 희석수로 PBS를 사용하였을 때 7.69 ± 1.13 log MPN/100 mL로 TCBS에 비하여 mL 당 2 log 이상 높은 균수가 측정되었다. PBS-Na를 희석수로 사용한 경우, LB-Na agar 및 TCBS agar에서는 각각 7.88 ± 0.05 및 5.42 ± 0.18 log CFU/mL의 *V. vulnificus* 균수가 측정되었고, MPN-PCR의 경우 9.07 ± 0.26 log MPN/100 mL로 나타났다. PBS를 희석수로 사용하였을 때와 유사하게 APW를 이용한 MPN-PCR의 경우,

TCBS agar에서의 결과와 비교하였을 때 *V. vulnificus* 균수가 mL 당 2 log 이상의 높은 균수가 측정되었다. 또한, MPN-PCR의 방법을 이용하여 측정된 *V. vulnificus* 균수는 LB-Na agar에서 측정된 균수와 유사하게 mL 당 약 7 log의 균수가 측정되었다. 이상의 결과를 종합해 보면, *V. vulnificus* 균수 측정에 2% NaCl이 첨가된 PBS-Na를 희석수로 사용하였을 때가 일반 PBS를 사용하였을 때보다 유의적으로 높은 균수가 측정되었다(Table 2). 이는 균의 생존과 증식에 염 농도의 영향을 많이 받는 *V. vulnificus*의 특성 때문인 것으로 판단되며, 다른 연구자들도 *V. vulnificus*는 염의 영향을 크게 받는다고 보고하고 있다^{18,19)}.

이상에서 기술한 것처럼 TCBS agar는 *Vibrio* spp.의 분리를 위한 선택배지로 다른 균의 증식을 억제하는 선택성이 강하여 손상된 세포의 경우는 해당 배지에서 배양이 잘 되지 않는 것으로 판단된다^{11,12,18)}. 본 연구에서 얻어진 결과를 종합해 보면, NaCl이 포함된 PBS 희석수와 APW 배지를 이용한 MPN-PCR 방법이 *V. vulnificus* 균수 정량 분석에 유용한 것으로 분석되었다. 향후, 본 연구에서 제시된 *V. vulnificus* 균수 정량분석 방법은 해수뿐만 아니라 어패류 등의 시료에서 *V. vulnificus*의 정량분석에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

Acknowledgement

이 논문은 2018년도 식품의약품안전처에서 시행한 용역 연구 개발과제의 연구개발비 지원(18162수산물542)에 의해 수행되었음.

국문요약

*V. vulnificus*는 그람음성의 호염성균으로 감염 되었을 경우, 복통과 발열 등의 급성 위장염을 일으키며 만성질환자에게 급성 패혈증을 일으키는 매우 높은 치사율의 식중독균이다. 식품 중에서 *V. vulnificus*를 분석하는 방법으로는 TCBS agar와 같은 선택배지를 이용하는 방법과 PCR을 이용한 방법이 있으나 온도, 염 및 pH 등과 같은 환경

요인에 민감한 *V. vulnificus*의 특성을 고려하였을 때 정확한 균수 정량을 위한 정량분석법 확립의 필요성이 요구된다. 본 연구에서는 배지 및 염 차이에 따른 *V. vulnificus* 생육 특성 차이에 대한 연구를 진행하였다. 그 결과, *V. vulnificus* 균수 정량분석에 APW 증균 배양을 이용한 MPN-PCR 방법이 적합하였다. 본 연구에서 제시된 방법은 해수뿐만 아니라 어패류 등의 시료에서 *V. vulnificus* 균수 정량분석에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

References

1. Korea Centers for Disease Control and Prevention: This year's first case of *Vibrio vulnificus* sepsis. Retrieved from <http://www.cdc.go.kr/CDC/notice/CdcKrIntro0201.jsp?menuIds=HOME006-MNU2804-MNU2937&cid=121780> on June 12, 2018.
2. Korea Centers for Disease Control and Prevention: Weekly infectious disease outbreak trend in 2018, No. 24. Retrieved from http://www.cdc.go.kr/CDC/intro/CdcKrInfectedend.jsp?menuIds=HOME006-MNU3003-MNU2935&fid=10663&q_type=&q_value=&cid=125225&pageNum=1 on June 15, 2018.
3. Klontz K.C., Lieb S., Schreiber M., Janowski H.T., Baldy L.M., Gunn R.A.: Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Ann. Intern. Med.*, **109**, 318-323 (1988).
4. Hlady W.G., Klontz K.C.: The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J. Infect. Dis.*, **173**, 1176-1183 (1996).
5. Kaspar C.W., Tamplin M.L.: Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2425-2429 (1993).
6. Oliver J.D.: Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol. Infect.*, **133**, 383-391 (2005).
7. Strom M.S., Paranjpye R.N.: Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect.*, **2**, 177-188 (2000).
8. Motes M.L., DePaola A., Cook D.W., Veazey J.E., Hunsucker J.C., Garthright W.E., Blodgett R.J., Chirtel S.J.: Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1459-1465 (1998).
9. Mahmud Z.H., Neogi S.B., Kassu A., Mai Huong B.T., Jahid I.K., Islam M.S., Ota F.: Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **64**, 209-218 (2008).
10. Blanco-Abad V., Ansele-Bermejo J., Rodriguez-Castro A., Martinez-Urtaza J.: Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **129**, 229-236 (2008).
11. Kaysner C.A., Tamplin M.L., Wekell M.M., Stott R.F., Colburn K.G.: Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3072-3079 (1989).
12. West P.A., Russek E., Brayton P.R., Colwell R.R.: Statistical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose agars. *J. Clin. Microbiol.*, **16**, 1110-1116 (1982).
13. Rudi K., Moen B., DrØmtorp S.M., Holck A.L.: Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1018-1024 (2005).
14. Cantet F., Hervio-Heath D., Caro A., Le Mennec C., Monteil C., Quéméré C., Jolivet-Gougeon A., Colwell R.R., Monfort P.: Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. *Res Microbiol.*, **164**, 867-74 (2013).
15. Barrera-Escorcia G., Wong-Chang I., Fernández-Rendón C.L., Botello A.V., Gómez-Gil B., Lizárraga-Partida M.L.: Quantification of *Vibrio* species in oysters from the Gulf of Mexico with two procedures based on MPN and PCR. *Environ Monit Assess.* **188**, 602 (2016).
16. Muhammad J.A., Ken-Ichi T., Shin-Ichi M., Sumio S.: Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol.*, **208**, 83-87 (2002).
17. Gitika P., Douglas R.C., Melissa J.K., Asim K.B.: Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7436-7444 (2004).
18. Randa M.A., Polz M.F., Lim E.: Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5469-5476 (2004).
19. Johnson C.N., Flowers A.R., Noriega N.F. 3rd, Zimmerman A.M., Bowers J.C., DePaola A., Grimes D.J.: Relationships between environmental factors and pathogenic *Vibrios* in the Northern Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 7076-7084 (2010).