

B317 Detection of Activity and Survival of the Natural Bacteria Under the Stressed Condition by Using Bioluminescent Phenotype

Hye-Young Yoon^{*1}, Kyoung-Je Park¹, Ho-Sa Lee², and Kyu-Ho Lee¹
¹Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies. ²Department of Biology, Kyung Hee University.

본 논문의 목적은 자연미생물에 *lux* 유전자를 주입하여 발광기능을 부여함으로써 그들의 발광정도가 자연계에서 발견되는 stress에 대한 적응, 생존 및 활성도를 나타낼 수 있는가, 그리고 이들의 non-culturable but viable (NCBV) 상태에 대한 정보를 제공할 수 있는가를 알아보는 데 있다. Conjugation으로 발광기능을 획득한 natural bacteria의 60일 간 starvation 조건 하에서 total cell, culturable cell, viable cell, relative light unit (RLU)의 변화를 조사하였다. Total cell 수의 변화는 없었으나, culturable cell 수는, viable cell 수보다 최대 10³배나 적은, 4°C, 30°C 각각 1.32%, 0.001% 이하로 줄어들었다. 같은 기간 RLU도 4°C가 0.25%까지, 30°C가 0.07%까지 감소하여 30°C 배양이 4°C보다 빠른 CFU와 RLU 감소율을 보였다. 아울러 stress를 받는 4시간 동안 culturable cell 수와 RLU의 관계를 알아보기 위하여 toxic materials (BTXP), heat (42°C), pH4, osmotic stresses를 주고 시간별로 CFU, RLU를 측정된 결과, CFU 당 RLU는 10.7-29.6% 까지 감소하였다. 이는 stress의 종류에 따라 접촉시간이 길수록 (toluene 제외) culturable cell 당 나오는 빛의 양이 줄어듦을 보인 것이다. 따라서 starvation 시 RLU는 CFU의 수에 의존하며, stress 하에서 RLU의 감소율이 CFU의 감소율보다 더 크므로, 발하는 빛의 정량만으로는 NCBV 상태는 물론 culturable cell의 abundance나 activity를 조사하기 어려울 것이다. 그러므로 stress 하의 RLU와 CFU의 관계를 알아보기 위하여, xylene, hypo-osmotic stress, starvation을 받은 cell의 발광증가를 위한 lag time을 측정하였고, 그 결과는 각각 32, 26, 22min으로 나타났다. 즉 미생물에 강력한 stress로 작용한 경우일수록 lag time이 길고, 또한 발광의 증가율이 느리며 도달하는 maximal RLU값도 낮음이 관찰되었다.

B318 The Natural Abundance of *Vibrio vulnificus* and Implication of the Presence of Non-Culturable but Viable (NCBV) State at the Chonnam Coastal Area

Ki-Don Song¹, Sung-Kuk Jung², Byung Cheol Cho¹, Kyu-Ho Lee²
¹Department of Oceanography, Seoul National University. ²Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies.

To investigate the relationship of the abundance/distribution of *Vibrio vulnificus*, fatal human pathogen, and frequency of occurrence of septicemia, its CFU at Chonnam coastal region was measured. The culturable *V. vulnificus* was determined by plate-counting on the selective medium (e.g., TCBS and CPC), and subsequently identified by *V. vulnificus*-specific PCR. The results suggest these selective media i) underestimated *V. vulnificus* CFU when the results derived from non-selective medium (LBS) were compared with, and ii) gave an inaccurate selectivity since only 24% of putative *V. vulnificus* isolates resulted in positive PCR. Thus, we developed the specific colony hybridization condition to detect only *V. vulnificus* among various marine CFUs by using hemolysin (*vvhA*) gene probe. Its CFU abundance detected by this method showed at most 100-fold higher than by the classical method. However, *V. vulnificus* CFU did not correlate with the frequency of septicemia reported. This does not result from the difference between pathogenic and non-pathogenic isolates, since both types have the same RFLP of their *vvhA* genes. Rather inconsistency between the change in the density of culturable *V. vulnificus* and the frequency of its disease indirectly suggests the presence of NCBV *V. vulnificus* in nature. Our laboratory experiments show starvation and low-temperature stimulate the shift to NCBV state. The research is progressing to quantify NCBV *V. vulnificus* in nature using PCR-MPN method.