

Comparison of LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Test and alamarBlue[®] Method for Enumeration of Live and Dead Bacteria for Oral Bacterial Species

Yeon-Hee Kim, and Si Young Lee*

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

(received November 21, 2012 ; revised December 11, 2012 ; accepted December 12, 2012)

LIVE/DEAD[®] BacLight[™] and alamarBlue[®] are fluorescent materials used for the enumeration of live and dead bacteria. LIVE/DEAD[®] BacLight[™] is generally used for confocal microscopy applications to differentiate live from dead bacteria in a biofilm or planktonic state. AlamarBlue[®] has also been used widely to assay live and dead bacteria in a planktonic state. Whilst these materials are successfully utilized in experiments to discriminate live from dead bacteria for several species of bacteria, the application of these techniques to oral bacteria is limited to the use of LIVE/DEAD[®] BacLight[™] in biofilm studies. In our present study, we assessed whether these two methods could enumerate live and dead oral bacterial species in a planktonic state. We tested the reagents on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Enterococcus faecalis* and found that only LIVE/DEAD[®] BacLight[™] could differentiate live from dead cells for all five of these oral strains. AlamarBlue[®] was not effective in this regard for *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans*. In addition, the differentiation of live

and dead bacterial cells by alamarBlue[®] could not be performed for concentrations lower than 2×10^6 cells/ml. Our data thus indicate that LIVE/DEAD[®] BacLight[™] is a more effective reagent for this analysis.

Key words: Bacteria, Fluorescence, Resazurin, Viridans Streptococci

서 론

항균물질이나 항생제의 세균 치사 효과 측정 시, 죽은 세균과 생존한 세균의 수를 측정하기 위한 고전적인 방법으로 세균을 고체배지에 도말 배양하여 세균의 집락 형성 단위(colony forming unit, CFU)를 측정하는 방법이 널리 이용되어 왔다. 집락 수를 측정하여 세균의 치사율을 결정하는 방법은 세균 배양을 통해 세포분열의 시작과 집락 형성이 될 수 있는 충분한 시간이 필요하다[1]. CFU 측정 방법은 구강 세균에 대한 항균효과를 확인하는 데 널리 사용되고 있지만 세균을 배양하는 데 시간이 걸리고 잘 자라지 않는 세균도 존재하기 때문에 어려움이 많다. 또한 이러한 고전적인 방법은 균주를 희석하여 도말하는 과정에서 오차가 발생하며 배지 제작 과정에 많은 노동력이 필요한 점 등 시간적인 제약과 경제 적이지 못한 점도 있다.

LIVE/DEAD[®] BacLight[™] bacterial viability kit (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)는 생존 세균과 죽은 세균의 양을 평가하는데 일반적으로 사용되고 있다 [1-3]. LIVE/DEAD[®] kit는 SYTO-9과 propidium iodide(PI)로

*Correspondence to: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea. Tel.: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410, E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

구성되어 있다. SYTO-9는 막 투과성이며 모든 세포막을 통과하여 핵산에 염색되어 녹색 형광을 나타낸다. 반면 PI는 막 비투과성이며 세포막이 손상된 세균의 핵산에 염색되고 붉은색 형광을 나타낸다[4]. SYTO-9과 PI 형광물질로 염색 시 살아있는 세균은 SYTO-9에 의해서 녹색으로 염색이 되며, 죽은 세균은 PI에 의해서 붉은색으로 염색 된다. LIVE/DEAD[®] kit로 염색된 세균 현탁액의 형광을 측정하여 녹색 형광과 붉은색 형광이 나타내는 수치의 비율(Ratio_{Green/Red})로 살아있는 세균 수를 계산할 수 있다. LIVE/DEAD[®] kit는 마시는 물의 세균 수 측정[1,2] 등 다양한 환경 시료에서 세균 양을 추정하는 데 사용[5]되고 있으며, confocal microscopy를 이용한 세균 biofilm 연구[3,6-8]에도 널리 사용되고 있다.

alamarBlue[®](Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)는 resazurin을 이용한 염료 환원 시험법의 일종이다. 산화상태에서는 푸른색이지만 살아있는 세포가 존재하여 염료가 환원되면 보라색으로 변하고 최종적으로 무색을 나타내게 된다[9]. 이 물질은 세포 막 투과성이며 독성이 없고, 푸른색일 때 형광을 나타내지 않는 반면 보라색일 때 높은 형광을 나타내게 되므로, 살아있는 세포의 환원 능력을 사용하여 살아 있는 세균의 양을 측정하는 데 사용된다. alamarBlue[®]는 인간의 혈액 내 세균에 대한 항균물질의 효과 확인[10]과 세균의 생존을 신속하게 분석하는 방법[11]으로 사용되었다.

구강 세균, 특히 구강혐기성 세균의 경우 CFU 측정을 위한 배지를 제작하는 과정이 까다로우며, 배지에 도달하기 위해 희석하는 과정에서 오차가 많이 발생한다. 또한 일부 구강 세균들은 성장 속도가 느리고 배양 조건이 까다로우며 집락이 형성되기까지 많은 시간이 소요된다. 앞선 연구에서 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]를 legionella 균종에 적용하여 이 세균의 생존과 치사를 측정하는 연구가 보고되었으며[12]. 또 다른 연구에서는 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]를 이용하여 *Lactobacillus rhamnosus* 와 *Bifidobacterium animalis* 의 생존여부를 확인[13]한 연구가 보고되었다. 그러나 구강세균의 경우에는 LIVE/DEAD[®] kit를 이용하여 biofilm을 염색하고 confocal microscopy를 사용하여 세균의 생존과 치사를 관찰한 실험이 대부분이며[14] LIVE/DEAD[®] kit 혹은 alamarBlue[®]를 현탁액 상태에서 구강세균의 생존과 치사의 정량적 측정에 사용한 보고는 아직 없다. 본 연구에서는 현탁액 상태의 구강세균의 생존과 치사의 측정에 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] bacterial viability kit와 alamarBlue[®] 방법을 적용할 수 있는지 여부를 조사하여 세균 종에 따른 차이, 측정 방법의 민감도를 관찰하였다.

본 연구에서는 *Streptococcus mutans* KN405, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *Enterococcus faecalis* KCTC 3206을 사용하였다. 구강연쇄구균은 강릉원주대학교 치과대학 미생물교실에 보관되어 있는 균주이고 다른 균주들은 조선대학교 치과대학의 한국구강미생물자원은행에서 분양을 받았다. 죽은 세균이 거의 없는 세균 현탁액을 얻기 위하여, 각각의 세균은 세균성장곡선을 측정하여 초기 log phase까지 배양한 세균을 실험에 사용하였다. *S. mutans*, *S. sobrinus*, *E. faecalis*는 Brain Heart Infusion (BHI)(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 액체배지에 37°C, 6시간 배양되었으며, *P. gingivalis*과 *A. actinomycetemcomitans*는 Trypticase Soy Broth(Becton, Dickinson and Company)에 yeast extract 1 mg/ml(Becton, Dickinson and Company), hemin 5 µg/ml(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 menadione 1 µg/ml(Sigma Chemicals Co.)을 첨가한 배지를 사용하여 90% N₂, 5% CO₂, 5% H₂를 포함하는 혐기성 환경(Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc. Cornelius, Oregon, USA)에서 18~20시간 배양되었다.

LIVE/DEAD[®] BacLight[™]와 alamarBlue[®] 사용방법

LIVE/DEAD[®] BacLight[™]와 alamarBlue[®]에서 제공하는 세균염색방법[9,15]을 따랐다. 세균을 30 ml 액체배지에 초기 log phase까지 배양하고 원심분리(10,000 rpm, 5분, 4°C)하였으며 0.85% NaCl 용액을 이용하여 2회 세정하였다. 100% 치사 세균을 얻기 위하여 70% isopropyl alcohol로 세균을 1시간 처리하고 0.85% NaCl 용액으로 1회 세정하였다. 준비된 'Live' 세균과 'Dead' 세균은 각각 SMART PLUS 2700(UV/VIS spectrophotometer, Youngwoo Instruments Corp, Seoul, Korea)를 사용하여 OD₆₆₀ 값을 측정하고 세균 대 OD값의 표준곡선을 이용하여 세균 수 2×10⁷ cells/ml의 세균 현탁액을 얻었다. 'LIVE' 세균과 'DEAD' 세균을 일정 비율 혼합하여 'LIVE' 세균의 비율이 0, 10, 50, 90, 100%(0:100, 10:90, 50:50, 90:10, 100:0)인 세균 현탁액을 각각 준비하였다. 혐기성세균의 준비에는 혐기성배양기에서 2일 이상 pre-reduce된 용액을 사용하였다. LIVE/DEAD[®] BacLight[™]와 alamarBlue[®]을 이용한 측정방법과 직접세균배양방법을 비교하기 위하여 %LIVE (0:100, 10:90, 50:50, 90:10, 100:0) 세균현탁액을 각각 100배 희석하여 각 세균 종의 고체배지에 100 µl씩 도말하여 배양한 후 CFU를 측정하였다.

LIVE/DEAD[®] BacLight[™]는 SYTO-9 6 µl 와 PI 6 µl를 dH₂O 2 ml에 희석하고 세균 100 µl당 희석한 시약을 100 µl씩 넣어주고 상온의 어두운 곳에서 15분 반응 시킨 후 Multilabel Reader(PerkinElmer, Turku, Finland)를 이용하여 형광을 측정하였다. 여기파장 485 nm, 방출파장 535 nm로 살

재료 및 방법

세균 및 배양 방법

아있는 세균에 해당하는 녹색을 측정하고, 여기파장 485 nm, 방출파장 610 nm로 손상된 세균을 나타내는 붉은색을 측정하였다. 실험은 세 개 한 벌로 시행하였으며 측정된 값의 평균을 이용하여 $\text{Ratio}_{\text{Green/Red}}$ ($\text{Ratio}_{\text{G/R}}$) 값을 얻었다.

alamarBlue®는 혼합한 세균 100 μl 당 시약을 10 μl 씩 처리한 뒤 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *E. faecalis*는 일반배양기에 *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*는 혐기성배양기에서 24시간 배양하고 Multilabel Reader(PerkinElmer, Turku, Finland)를 이용하여 여기파장 544 nm, 방출파장 610 nm로 살아있는 세균의 양을 측정하였다. 실험은 세 개 한 벌로 시행하였다.

세균 수에 따른 민감도 측정방법

세균 수에 따른 측정 방법의 민감도를 조사하기 위하여 *S. mutans* KN405를 실험에 사용하였다. 위와 동일한 방법으로 세균을 준비하고 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 cells/ml 세균 농도로 희석하여 준비하고 %LIVE 비율(0, 10, 50, 90, 100%)로 섞었다. LIVE/DEAD® BacLight™와 alamarBlue® 시약을 'LIVE/DEAD® BacLight™와 alamarBlue® 사용방법'에서 기술한 대로 처리하고 형광을 측정하였다.

결 과

LIVE/DEAD® BacLight™를 이용한 생존 세균 수 측정

LIVE/DEAD® BacLight™를 이용하여 세균 현탁액 내 생존세균의 비율과 $\text{Ratio}_{\text{G/R}}$ 값의 상관관계를 조사하였다(Fig. 1). LIVE/DEAD® BacLight™ 측정 결과 실험에 사용한 모든 구강세균종에서 현탁액 내 %LIVE 세균비율이 증가함에 따라 $\text{Ratio}_{\text{G/R}}$ 수치가 비례하여 증가하는 것이 관찰되었다. *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 경우에는 같은 Streptococci임에도 불구하고 동일한 %LIVE 세균비율에서도 $\text{Ratio}_{\text{G/R}}$ 수치가 일치하지는 않았다. *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*와 *E. faecalis*의 경우에도 현탁액 내 %LIVE 세균비율이 증가함에 따라 $\text{Ratio}_{\text{G/R}}$ 수치가 비례하여 증가하였다. LIVE/DEAD® BacLight™를 이용한 측정방법과 직접세균배양 방법을 비교하기 위하여 %LIVE 세균비율이 다른(0:100, 10:90, 50:50, 90:10, 100:0) 세균현탁액을 각 세균 종의 고체배지에 도말하여 배양한 후 CFU를 측정한 결과 LIVE/DEAD® BacLight™를 이용한 %LIVE 세균 비율과 동일하게 CFU도 측정되었다.

alamarBlue®를 이용한 생존 세균 수 측정

alamarBlue®를 이용하여 세균의 살아있는 비율을 측정할 결과는 Fig. 1에 보였다. *S. mutans*와 *S. sobrinus*는 생존세균 수의 증가에 따라 형광이 비례하여 증가하였지만, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*의 경우에는 생존세균수

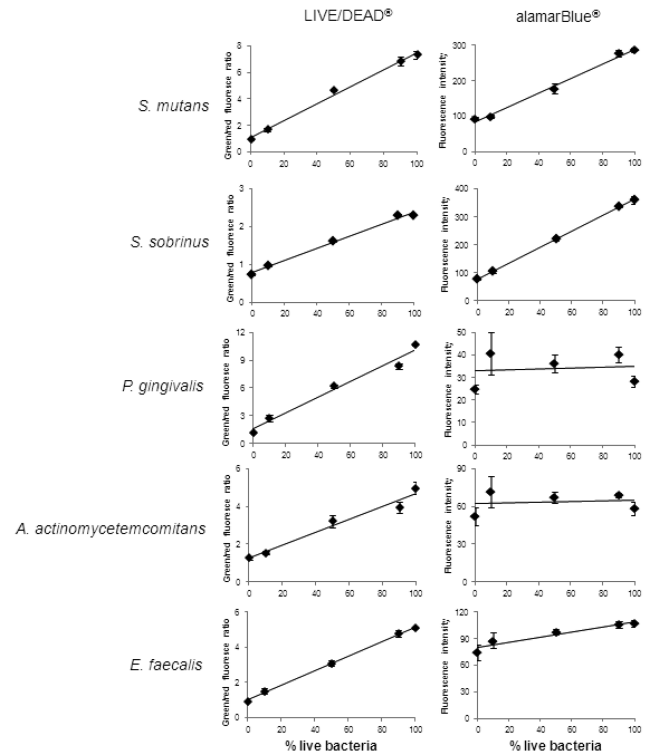


Fig. 1. Relationship of % live bacteria and fluorescence by LIVE/DEAD® BacLight™ and alamarBlue® for enumeration of live and dead oral bacteria. Values indicate means of triplicate determinations; standard deviations of the mean (error bars) are indicated by vertical lines.

의 증가가 형광의 증가와 연관이 없었다. *E. faecalis*는 *P. gingivalis*와 *A. actinomycetemcomitans*의 경우보다는 생존세균수와 형광의 강도 간의 비례 관계를 보였지만 구강연쇄구균에 비하여 생존세균수의 차이에 따른 형광의 차이가 크지 않았다.

세균 수에 따른 민감도 차이

세균 수에 따른 민감도의 차이를 확인하기 위하여 *S. mutans*를 사용하여 세균 수에 따른 민감도를 비교 실험을

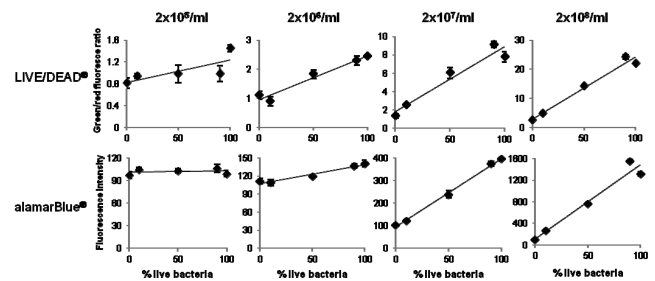


Fig. 2. Relationship of % live bacteria and fluorescence by LIVE/DEAD® BacLight™ and alamarBlue® for enumeration of different concentration of live and dead *S. mutans*. Values indicate means of triplicate determinations; standard deviations of the mean (error bars) are indicated by vertical lines.

하였다(Fig. 2). 2×10^6 cells/ml 이상 농도의 세균 현탁액에서는 생존세균수의 증가에 따라 LIVE/DEAD[®]의 Ratio_{G/R} 수치가 비례하여 증가하였지만 2×10^5 cells/ml에서는 생존세균수에 비례하여 LIVE/DEAD[®]의 Ratio_{G/R} 수치가 일정하게 증가하지는 않았다. alamarBlue[®]도 세균 수가 2×10^7 cells/ml 이상일 때부터 연관성이 증가하는 것을 관찰하였다.

고 찰

본 연구에서는 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]과 alamarBlue[®]를 이용하여 현탁액 상태의 구강세균의 생존세균수와 치사세균수를 측정할 수 있는지를 조사하였다. LIVE/DEAD[®] BacLight[™]와 alamarBlue[®]를 이용한 생존세균수와 형광 수치의 연관 관계 측정 결과에서 전반적으로 alamarBlue[®]보다는 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]의 연관성이 크게 나타났다. Streptococci의 경우 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]와 alamarBlue[®] 모두 적용이 가능할 것으로 생각되며, 같은 streptococci라도 종이 다르면 측정값이 다르게 관찰되었다. alamarBlue[®]의 경우 *S. mutans*와 *S. sobrinus*는 생존세균수의 증가에 따라 형광이 비례하여 증가하였지만, 혐기성 세균인 *P. gingivalis*과 미세호기성인 *A. actinomycetemcomitans*의 경우에는 생존세균수의 증가가 형광의 증가와 연관이 없었다. 이러한 차이가 세균의 혐기적 배양과 연관이 있는지를 조사하기 위하여 *S. mutans*를 혐기성 환경에서 배양 후 alamarBlue[®]를 이용하여 실험해 본 결과, 일반 배양한 결과와 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인하였다(data not shown). 즉 *P. gingivalis*와 *A. actinomycetemcomitans*의 경우 alamarBlue[®]의 적용이 어려운 이유는 세균의 혐기적 배양 조건 때문이 아니라 세균 자체의 특성인 것으로 생각된다. 절대 혐기성세균인 *P. gingivalis*는 산소가 있으면 살 수 없는데 이는 superoxide dismutase와 카탈라아제 중 하나 또는 둘 다 없기 때문이다. 미세호기성인 *A. actinomycetemcomitans*의 경우에도 alamarBlue[®]의 적용이 어려운 것으로 보아 *P. gingivalis*에 alamarBlue[®]의 적용이 어려운 이유가 단순히 세균의 혐기적 성질 때문은 아닌 것으로 생각된다. 이들 세균의 산화반응과 관련된 생리적인 특성 때문에 이러한 현상을 보인 것으로 생각되지만 정확한 기전은 더 연구가 되어야 할 것이다. *P. gingivalis*와 *A. actinomycetemcomitans*는 alamarBlue[®]보다는 LIVE/DEAD[®]를 사용한 측정이 더 정확한 것으로 조사되었다. alamarBlue[®] 측정을 위한 실험 과정에서 시약의 첨가 후 24시간까지는 배양 시간이 길수록 정확도가 높아진다고 회사에서 제공한 설명서에 기술되어 있으나 최소 4시간 배양 후에도 24시간 경과 후 측정된 결과에서 큰 차이는 보이지 않았다. 세균 수에 따른 민감도 조사에서 LIVE/DEAD[®]와 alamarBlue[®]

모두 균주의 농도에 따라서 시약의 민감도가 차이를 보이는 것을 확인하였으며, 균주의 최소 농도는 2×10^7 cells/ml가 되어야 정확도가 높아질 것으로 여겨진다.

이전 연구에서 Lactobacillus 종에 대한 CFU 측정과 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 측정결과 비교 시 CFU 측정 값보다 LIVE/DEAD[®]에서 살아있는 세균의 양 측정이 용이하다고 보고 되었다[16]. 구강세균에 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]과 alamarBlue[®]의 적용은 CFU 측정을 위한 희석과정과 배지를 만드는 어려움을 줄여 줄 것이며, alamarBlue[®]보다 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]가 구강세균의 치사, 생존 세균수의 측정에 정확도가 더 높을 것으로 생각된다. 본 연구에서 실험에 사용된 세균의 종류는 구강 질환에 연관이 되어 있는 대표적인 세균 중의 일부이지만 구강 내에는 본 실험에 사용된 세균 이외에도 많은 종류가 분포하고 있기 때문에 다른 구강 세균에 대한 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다. 본 실험에서는 현탁액 상태의 세균을 대상으로 실험하였는데, 앞으로 Biofilm 상태이거나 덩어리 상태의 세균에서도 LIVE/DEAD[®]와 alamarBlue[®]를 사용하여 치사 세균과 생존 세균의 정량적인 측정할 수 있는지 조사할 필요가 있다. 본 연구에서는 현탁액 상태의 구강세균의 생존세균수와 치사세균수의 측정에 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]와 alamarBlue[®] 방법을 적용할 수 있는지 여부를 조사하였으며, 본 연구를 통하여 구강세균의 생존과 치사에 따른 세균 수 측정에도 이들 방법, 특히 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]이 편리하게 이용될 수 있음을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2010-0025532)

참 고 문 헌

1. Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight : Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J Microbiol Methods. 1999;37: 77-86.
2. Lu W, Wang Y, Zhang XJ. Methods of enumeration of bacteria in drinking water. Huan Jing Ke Xue. 2004;25:167-9.
3. Chavez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. Appl Environ Microbiol. 2011;77:3892-5.

4. Stocks SM. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry A*. 2004;61:189-95.
5. Biggerstaff JP, Le Puil M, Weidow BL, Prater J, Glass K, Radosevich M. et al. New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol Cell Probes*. 2006;20:141-6.
6. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J*. 2007;40:344-55.
7. Welin-Neilands J, Svensater G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:5633-8.
8. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol*. 2010;61:411-6.
9. alamarBlue[®] cell viability reagent product information. 2008. (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/DAL1025?ICID=search-dal1025>)
10. DeForge LE, Billeci KL, Kramer SM. Effect of IFN-gamma on the killing of *Staphylococcus aureus* in human whole blood. assessment of bacterial viability by CFU determination and by a new method using alamarBlue. *J Immunol Methods*. 2000;245:79-89.
11. Carroll J, Douarre P, Coffey A, Buckley J, Cashman B, O'Farrell K. et al. Optimization of a rapid viability assay for mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by using alamarBlue. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:7870-2.
12. Giao MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. *Microb Ecol*. 2009;58:56-62.
13. Alakomi HL, Matto J, Virkajarvi I, Saarela M. Application of a microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic preparations. *J Microbiol Methods*. 2005;62:25-35.
14. Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK. et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:2605-12.
15. LIVE/DEAD[®] BacLight[™] bacterial viability kits product information. 2004. (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/L7007?ICID=search-l7007>)
16. Auty MA, Gardiner GE, McBrearty SJ, O'Sullivan EO, Mulvihill DM, Collins JK. et al. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:420-5.