

Short Communication

## MPN-PCR 방법을 이용한 *Vibrio vulnificus* 균수 정량분석

장유미 · 박슬기 · 정희진 · 이장원 · 윤요한<sup>1</sup> · 박권삼<sup>2</sup> · 신일식<sup>3</sup> · 김영목\*

부경대학교 식품공학과, <sup>1</sup>숙명여자대학교 식품영양학과,  
<sup>2</sup>군산대학교 식품생명공학과, <sup>3</sup>강릉원주대학교 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 Yoon<sup>1</sup>,  
Kwon-Sam Park<sup>2</sup>, Il-Shik Shin<sup>3</sup>, and Young-Mog Kim\*

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

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan, Korea

<sup>3</sup>Department 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<sup>(1,2)</sup>. 2012년에서부터 2017년의 최근 6년간 321명의 비브리오 패혈증 환자가 발생하였고 이 중 156명이 사망하여 48.6%의 높은 치사율이 보고되었다<sup>(1)</sup>. 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<sup>(1-3)</sup>. *V. vulnificus*는 일반적으로 수온, 염도 및 pH 등의 환경 요인에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다<sup>(4-9)</sup>. 수온의 경우 9°C에서 31°C 사이의 온도에서 생육 가능하고 18°C 이상일 때 최적으로 증식하며<sup>(4,5)</sup>, 5%에서 35% 사이의 염도에서 생육이 가능하고 25%의 염도에서도 증식 한다<sup>(6-8)</sup>. 또한, pH 5~10의 조건에서 생육이 가능하며 pH 7.8이 최적 조건으로 알려져 있다<sup>(9)</sup>.

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<sup>(10)</sup>. 하지만, TCBS는 *Vibrio* spp.의 선택적 분리배양에 사용되는 선택배지로 균수 정량 실험의 경우에는 적합하지 않다는 보고가 많다<sup>(11,12)</sup>. 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<sup>(13)</sup>. 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<sup>14,15</sup>. 또한, *V. vulnificus*는 염, pH 그리고 온도 등의 환경인자 변화에 취약하여<sup>4,9</sup>, TCBS를 이용한 균수 측정법으로는 정확한 균수 정량에 어려움이 있다고 보고되고 있다<sup>11,12,16</sup>. 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 10<sup>9</sup> 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 수행되었으며<sup>17</sup>, *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 10<sup>7</sup> 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<sup>16,18</sup>. 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 <sup>1)</sup>	LB-Na	TCBS <sup>2)</sup>	MPN-PCR <sup>3)</sup>
6.59 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.25 ± 0.56 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.23 <sup>b</sup>	4.49 ± 0.96 <sup>d</sup>
(log CFU/mL)	(log CFU/mL)	(log CFU/mL)	(log MPN/100 mL)

One mL of *V. vulnificus* cells (about 10<sup>9</sup> 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. <sup>1)</sup>LB-Na, Luria-Bertani broth containing 2% NaCl; <sup>2)</sup>TCBS, thiosulfate citrate bile salts sucrose medium; <sup>3)</sup>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. <sup>a-c</sup>, 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 <sup>1)</sup> / LB-Na <sup>2)</sup>	PBS/TCBS <sup>3)</sup>	PBS/ MPN-PCR <sup>4)</sup>	PBS-Na <sup>5)</sup> / LB-Na	PBS-Na/ TCBS	PBS-Na/ MPN-PCR
Viable cells count	7.06 ± 0.44 <sup>a</sup> (log CFU/mL)	3.74 ± 0.79 <sup>b</sup> (log CFU/mL)	7.69 ± 1.13 <sup>c</sup> (log MPN/100 mL)	7.88 ± 0.05 <sup>a</sup> (log CFU/mL)	5.42 ± 0.18 <sup>c</sup> (log CFU/mL)	9.07 ± 0.26 <sup>a</sup> (log MPN/100 mL)

One mL of *V. vulnificus* cells (about 10<sup>9</sup> CFU/mL) were suspended into 9 mL of 0.1 M phosphate buffer saline buffer (PBS, pH 7.0). <sup>1)</sup>PBS, phosphate buffer saline; <sup>2)</sup>LB-Na, Luria-Bertani broth containing 2% NaCl; <sup>3)</sup>TCBS, thiosulfate citrate bile salts sucrose medium; <sup>4)</sup>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; <sup>5)</sup>PBS-Na, phosphate buffer saline containing 2% NaCl. <sup>a-c</sup>, 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 판단된다<sup>18)</sup>. 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<sup>16,18)</sup>. 다른 연구자들도 손상된 *Vibrio* spp.의 경우 TCBS agar 등의 선택배지에서 증식이 잘 되지 않는다는 연구 결과를 보고하고 있다<sup>11,12,16,18)</sup>.

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<sup>16,18)</sup>. 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<sup>18,19)</sup>.

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<sup>11,12,18)</sup>. 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](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).