



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사학위논문

최확수법과 중합효소연쇄반응을

이용한 비브리오 패혈증균 정량

분석법 확립 및 검증



2019년 2월

부경대학교대학원

식품공학과

장유미

공학석사학위논문

최확수법과 중합효소연쇄반응을
이용한 비브리오 패혈증균 정량
분석법 확립 및 검증

지도교수 김영목

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2019년 2월

부경대학교대학원

식품공학과

장유미

이 논문을 장유미의 공학석사
학위논문으로 인준함

2019년 2월 22일



위 원 장: 농학박사 양 지 영 (인)

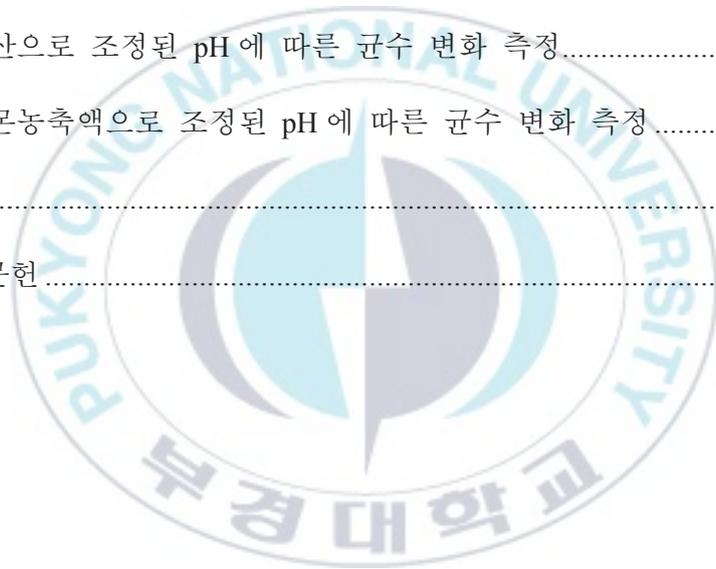
위 원 : 공학박사 전 병 수 (인)

위 원 : 약학박사 김 영 목 (인)

목 차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법.....	4
1. 균주 및 배양 조건.....	4
2. 실험방법.....	4
가. <i>V. vulnificus</i> 정량 분석법	4
(1) 평판도말법.....	4
(2) 최확수법 및 중합효소연쇄반응을 이용한 방법(MPN-PCR).....	5
나. <i>V. vulnificus</i> 정량분석 조건 확립.....	6
(1) 증류수에 노출된 <i>V. vulnificus</i> 균수 측정에 대한 배지의 영향.....	6
(2) <i>V. vulnificus</i> 균수 측정에 대한 희석수의 영향.....	6
다. <i>V. vulnificus</i> 정량분석 조건 검증.....	7
(1) 온도 변화에 따른 균수 변화 측정	7
(2) pH 변화에 따른 균수 변화 측정.....	7
3. 통계분석.....	8
III. 결과 및 고찰.....	10
1. <i>V. vulnificus</i> 정량분석 조건 확립.....	10
가. 증류수에 노출된 <i>V. vulnificus</i> 균수 측정에 대한 배지의 영향.....	10

나. <i>V. vulnificus</i> 균수 측정에 대한 희석수의 영향	13
2. <i>V. vulnificus</i> 정량분석 조건 검증	16
가. 용수의 온도에 따른 균수 변화 측정	16
나. 용수의 pH 에 따른 균수 변화 측정	24
(1) 초산으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정	24
(2) 구연산으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정	28
(3) 젖산으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정	32
(4) 레몬농축액으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정	36
IV. 요약	40
V. 참고문헌	42



List of Tables

Table 1. List of organic acid and lemon juice used in this study	9
Table 2. Effect of culture medium for cell count of <i>Vibrio vulnificus</i> by the treatment of distilled water	12
Table 3. Effect of dilution buffer and culture medium for cell count of <i>Vibrio vulnificus</i>	15
Table 4. Changes of viable cell counts of <i>Vibrio vulnificus</i> exposed in distilled water according to various quantitative cell count methods	20
Table 5. Changes of viable cell counts of <i>Vibrio vulnificus</i> exposed in purifier water according to various quantitative cell count methods	21
Table 6. Changes of viable cell counts of <i>Vibrio vulnificus</i> exposed in tap water according to various quantitative cell count methods	22
Table 7. Changes of viable cell counts of <i>Vibrio vulnificus</i> exposed in sea water according to various quantitative cell count methods	23
Table 8. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in purifier water adjusted pH values with acetic acid according to various quantitative cell count methods.....	26
Table 9. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in tap water adjusted pH values with acetic acid according to various quantitative cell count methods.....	27

Table 10. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in purifier water adjusted pH values with citric acid according to various quantitative cell count methods.....	30
Table 11. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in tap water adjusted pH values with citric acid according to various quantitative cell count methods.....	31
Table 12. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in purifier water adjusted pH values with lactic acid according to various quantitative cell count methods.....	34
Table 13. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in tap water adjusted pH values with lactic acid according to various quantitative cell count methods.....	35
Table 14. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in purifier water adjusted pH values with lemon juice acid according to various quantitative cell count methods.....	38
Table 15. Changes of viable cell counts of <i>V. vulnificus</i> exposed in tap water adjusted pH values with lemon juice according to various quantitative cell count methods.....	39

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

Method and It's verification

Yu Mi Jang

Department of Food Science and Technology, The Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

Vibrio vulnificus is an opportunistic pathogen which is highly lethal and responsible for the majority of seafood-associated deaths worldwide. The common method used for the detection of *V. vulnificus* was utilized thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS). The objective of this study is to establish a quantitative count method of *V. vulnificus*, and the most frequent method for quantitative cell count was plate count method. However, using TCBS agar plate for viable cell count of *V. vulnificus* is not suitable to detect the damaged *V. vulnificus* due to growth inhibition by high selectivity. In this study, I suggested a most probable number-

polymerase chain reaction (MPN-PCR) method using alkaline peptone water medium for quantitative cell count of *V. vulnificus*. And the MPN-PCR method developed in this study was used to analyze the effect of salinity, temperature and organic acid-adjusted pH on *V. vulnificus*. The MPN-PCR method showed 2 log higher cell number than that of TCBS agar plate. Similar result was also found in the control, which is Luria-Bertani agar containing 2% NaCl. As a result of analyzing the environmental factors using the MPN-PCR method, *V. vulnificus* was more salinity-dependent than temperature. It can also be seen that low pH such as pH 4, 5 affects *V. vulnificus* growth. Among them, the water adjusted with acetic acid was controlled *V. vulnificus* the greatest. Therefore, the MPN-PCR method can be utilized a sensitive method for the quantitative detection of viable cell count of *V. vulnificus* in fish as well as shellfish samples. In addition, it is possible to suggest a method for enhancing the hygienic safety of aquatic products by conducting *V. vulnificus* control research.

. 서론

전 세계적으로 수인성 및 식품을 매개로 패혈증을 유발하는 그람 음성 호염성균의 비브리오 패혈증균(*Vibrio vulnificus*)은 상처에 균이 감염된 경우나 가열 등의 처리없이 수산물을 섭취하였을 경우 패혈증을 유발할 수 있으며 사람뿐만 아니라 오염된 해수나 어패류 등에서도 분리가 가능하다. 질병관리본부(Korea Centers for Disease Control and Prevention, KCDC)의 국내 비브리오 패혈증 환자 발생 현황 보도자료에 따르면 수온이 높은 여름철, 특히 9 월에 비브리오 패혈증이 가장 많이 발생한다고 보고하고 있다. 또한 2012 년에서부터 2017 년의 최근 6 년간의 비브리오 패혈증의 치사율은 발병자 321 명 대비 사망자 156 명으로 48.6%의 높은 치사율이 보고되었다. 비브리오 패혈증의 일반적인 증상으로는 설사, 오한, 구토 등이 있지만 장기이식환자, 면역결핍환자 및 만성질환에 속하는 당뇨병, 간 질환 등의 환자는 패혈증 쇼크를 일으켜 사망에 이르게 되므로 각별한 주의가 요구된다(Klontz et al., 1988).

해양 미생물인 *V. vulnificus* 은 염도, 수온 및 pH 등의 환경 요인에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 염도 5%~35%, 온도 9 ~31 및 pH 5~10 이 이 균의 생육 조건이며, 그 중, 염도 25%, 온도 18 이상 및 pH 7.8 일 때, 생육 최적 조건으로 알려져 있다(Oliver et al., 2005; Strom et al., 2000; Motes et al., 1998; Hlady et al., 1996; Kaspar., 1993; Mahmud et al., 2008).

현재 해수 및 식품에 존재하는 *Vibrio* spp. 를 분리하기 위하여 대표적인 두가지 방법이 사용되고 있다. 첫 번째로 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar 및 CHROM agar 등의 선택 배지를 이용하여 분리 배양하는 방법이 있으나 이러한 배지들은 선택성이 높아 균수 정량의 경우 적합하지 않다는 보고되고 있다(Kaysner et al., 1989; West et al., 1982). 두 번째로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 목적 유전자를 증폭하는 방법이 있다(Blanco-Abad et al., 2008). 이 방법은 사균의 DNA 를 포함하여 단순히 시료 중에 존재하는 목적 DNA 를 증폭하기 때문에 목적 균의 정성적 검출은 가능하지만 균수 정량에 적합하지 않다고 보고 되고 있다(West et al., 1982). 이에 *Vibrio* spp. 을 정량 분석하기 위하여

최확수법(most probable number method, MPN) 및 PCR 방법을 병행한 MPN-PCR 방법을 사용하고 있다(Nandi et al., 2000; Kim et al., 2015; Ubong et al., 2011). 이상에서 기술한 것처럼 염, pH 그리고 온도 등의 환경적인 스트레스에 취약하다고 보고되고 있는 *V. vulnificus* 는 TCBS 등의 선택 배지를 이용한 정량 분석법으로는 정확한 균수 정량에 어려움이 있다고 판단된다(Kaysner et al., 1989).

본 연구에서는 심각한 식중독 감염 사고를 발생시키는 식중독 세균인 *V. vulnificus* 정량 분석법을 확립하기 위하여 배양 배지와 희석수 등의 변수에 따른 *V. vulnificus* 균수 변화를 분석하였고 이를 바탕으로 *V. vulnificus* 균수 정량 분석을 위한 MPN-PCR 방법의 조건을 검토 하였다. 또한, 온도, 염 및 pH 등의 다양한 조건에서 기존의 *V. vulnificus* 균수 정량 분석법과 MPN-PCR 을 이용한 정량 분석법을 비교 및 검증하였다.

. 재료 및 방법

1. 균주 및 배양 조건

본 연구에 사용한 균주는 한국미생물자원센터[Korea Collection for Type Cultures (KCTC), Daejeon, Korea]에서 분양 받은 *V. vulnificus* KCTC 41665 균주를 사용하였으며, 2% NaCl 이 첨가된 Luria-Bertani broth (LB; Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 35 에서 12 시간 동안 배양한 후 사용하였다.

2. 실험방법

가. *V. vulnificus* 균수 정량 분석법

(1) 평판 도말법

일반균수 측정법으로 진행한 *V. vulnificus* 균수 측정에는 LB-Na agar 와 TCBS (Difco, Detroit, MI, USA; pH 8.6±0.2) agar 가 사용되었고, 멸균된 생리 식염수 9 mL 에 단계별로 희석한다. 각 단계 희석액 1mL 를 LB-Na agar 와 TCBS agar 에 분주하여

접종한 후 35°C에서 12±2 시간 배양한 후 생성된 집락수를 측정하였다.

(2) 최확수법과 중합효소연쇄반응을 이용한 방법(MPN-PCR assay)

MPN-PCR 방법을 이용한 *V. vulnificus* 균수 측정은 단계별로 희석된 APW 를 35°C에서 12±2 시간 증균 배양한 후 PCR 을 통해 *V. vulnificus* 양성 band 를 확인하여 MPN 표로 균수를 측정하였다. PCR 에 사용된 *V. vulnificus* 분석용 primer 와 PCR 조건은 Han and Ge 의 보고에 따라 수행되었으며(Han and Ge., 2015), *V. vulnificus* 의 특이 primer (sense: 5'-CAGCCGGACGTCGTCCATTT G-3'; antisense: 5'-ATGAGTAAGCGTCCGACGCGT-3')를 사용하였다. PCR 은 Pre-denaturation 과정으로 94°C 에서 5 분, denaturation 94°C 30 초, annealing 60°C 30 초, elongation 72°C 30 초로 25 cycle 반복하였으며 최종 elongation 72°C 에서 10 분간 실시하였다.

나. *V. vulnificus* 균수 정량 분석 조건 확립

(1) 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 10^9 CFU/mL)을 현탁하고 25°C에서 10 분간 처리하였다. 처리된 현탁액을 위에서 기술한 바와 같이 LB-Na agar 와 TCBS agar 에 도말하여 균수를 측정하였고, MPN-PCR 방법으로도 균수를 측정하였다.

(2) *V. vulnificus* 균수 측정에 대한 희석수의 영향

V. vulnificus 의 균수 분석에 미치는 희석수의 영향은 다음과 같은 방법에 따라 진행하였다. *V. vulnificus* 가 약 10^7 CFU/mL 되도록 현탁된 해수 시료 1 mL 을 9 mL 의 0.1 M phosphate buffer saline buffer (PBS, pH 7.0)와 2% NaCl 이 첨가된 PBS(이하 PBS-Na)에 각각 희석하였다. 각 단계별 희석 용액은 위에서 기술한 바와 같이 LB-Na agar 와 TCBS agar 에 도말하여 35°C에서 12 ± 2

시간 배양 후 생성된 집락수를 계수하였고, MPN-PCR 방법으로도 균수를 측정하였다.

다. *V. vulnificus* 균수 정량 분석 조건 검증

(1) 온도 변화에 따른 균수 변화 측정

본 연구에서 사용된 용수는 증류수, 수돗물, 정수기물, 해수로 각 용수에 노출된 *V. vulnificus* 에 대한 온도의 영향은 다음과 같은 방법에 따라 진행하였다. 각 용수들은 미리 멸균한 뒤 사용하였으며 온도를 0℃, 10℃, 25℃로 맞춰놓은 각 용수 50 mL 에 *V. vulnificus* 가 약 10^7 CFU/mL 되도록 현탁하여 10 분간 각 온도에 방치한 후 균수 변화를 측정하였다. PBS-Na 를 사용하여 희석하였고 각 단계별 희석 용액은 위에서 기술한 LB-Na agar 를 이용한 평판 도말법 및 MPN-PCR 방법으로 *V. vulnificus* 균수를 측정하였다.

(2) pH 변화에 따른 균수 변화 측정

본 연구의 pH 조정에 사용된 유기산은 Table 1.과 같았다. 식품공전에서 식품첨가제로 활용되는 유기산 3 종류(acetic acid,

citric acid, lactic acid)와 현장에서 구매가 용이한 레몬농축액을 이용하였다. 실온에서 24 시간이상 안정화된 수돗물 및 정수기물에 대하여 각 유기산으로 pH 를 조정하고 멸균하였다. 각 용수에 노출된 *V. vulnificus* 에 대한 pH 의 영향은 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 각 용수 50 mL 에 *V. vulnificus* 가 약 10^7 CFU/mL 되도록 현탁하여 10 분간 실온에 방치한 뒤 위에서 기술한 방법으로 균수를 측정하였다.

3. 통계분석

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

Table 1. List of organic acid and lemon juice used in this study

Organic acid	Company	Type	Characteristic
Acetic acid (AA)	Sigma-Aldrich	Powder	>99.5%
Citric acid (CA)		Powder	>99.5%,
Lactic acid (LA)		Liquid	88.0~92.0%
Lemon juice (LJ)	EUROFOOD S.R.L	Liquid	5X concentration

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. *V. vulnificus* 균수 정량 분석 조건 확립

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

Vibrio spp. 균은 생육과 증식에 있어 염 농도에 의존적이므로 염의 농도가 낮을 경우, 세포가 손상된다고 보고되고 있다(Muhammad et al., 2002; Randa et al., 2004). 이에 본 연구에서는 증류수에 *V. vulnificus* 를 노출시킨 후 배지에 따른 균수 변화를 분석한 결과는 Table 2 와 같았다. 증류수에 10 분간 처리된 *V. vulnificus* 는 처리하지 않은 대조구와 비교하였을 때 균수의 감소가 나타났다. 이는 다른 연구자들의 보고와 마찬가지로 염이 없는 조건에서 *V. vulnificus* 세포가 손상되어 사멸되기 때문으로 판단된다(Randa et al., 2004). 하지만, 배지별로 균수의 차이가 관찰되었다. LB-Na agar 및 TCBS agar 에서는 각각 2.25 ± 0.56 및 0.13 ± 0.23 log CFU/mL 의 균수가 측정되었으나, APW 를 이용한 MPN-PCR 의 경우 4.49 ± 0.96 log

MPN/100mL 로 TCBS agar 와 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 TCBS 에서 증식이 잘 되지 않지만 APW 를 이용한 MPN-PCR 의 경우 증균 배양에 의해 손상된 세포가 회복되기 때문에 LB-Na agar 와 비슷한 균수가 측정된 것으로 생각된다(Muhammad et al., 2002; Randa et al., 2004). 다른 연구자들도 손상된 *Vibrio* spp. 의 경우 TCBS agar 등의 선택배지에서 증식이 잘 되지 않는다는 연구 결과를 보고하고 있다(Kaysner et al., 1989; West et al., 1982; Muhammad et al., 2002; Randa et al., 2004).

이상의 결과는 TCBS agar 와 같은 선택 배지는 균수 정량 분석용 배지로는 적합하지 않고 APW 를 이용한 MPN-PCR 방법이 손상된 *V. vulnificus* 균수 정량에도 유용하게 적용될 수 있다는 것을 제시하고 있다(Muhammad et al., 2002; Randa et al., 2004). 또한, 다양한 균들이 오염되어 있는 어·패류 등의 시료에서 *V. vulnificus* 균수 정량 분석에 MPN-PCR 방법이 유용하게 적용될 수 있다는 것을 의미한다.

Table 2. Effect of culture medium for cell count of *V. vulnificus* by the treatment of distilled water

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

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).

나. *V. vulnificus* 균수 측정에 대한 희석수의 영향

어·패류 등의 환경 시료에 존재하는 *V. vulnificus* 의 균수를 정량 분석하기 위한 기초 자료를 확보하기 위하여 정량분석법에 대한 희석수의 영향을 측정한 결과는 Table 3. 와 같았다. *V. vulnificus* 균수 측정에 PBS 를 희석수로 사용하였을 때, LB-Na 및 TCBS 에서 각각 7.06 ± 0.44 및 3.74 ± 0.79 log CFU/mL 의 균수가 측정되었다. 반면, APW 을 이용한 MPN-PCR 의 경우 희석수로 PBS 를 사용하였을 때 7.69 ± 1.13 log MPN/100mL 로 TCBS 에 비하여 mL 당 2 log 이상 높은 균수가 측정되었다. PBS-Na 를 희석수로 사용한 경우, LB-Na agar 및 TCBS agar 에서는 각각 7.88 ± 0.05 및 5.42 ± 0.18 log CFU/mL 의 *V. vulnificus* 균수가 측정되었고, MPN-PCR 의 경우 9.07 ± 0.26 log MPN/100mL 로 나타났다. PBS 를 희석수로 사용하였을 때와 유사하게 APW 을 이용한 MPN-PCR 의 경우, TCBS agar 에서의 결과와 비교하였을 때 *V. vulnificus* 균수가 mL 당 2 log 이상의 높은 균수가 측정되었다. 또한, MPN-PCR 의 방법을 이용하여 측정된 *V. vulnificus* 균수는 LB-Na agar 에서 측정된 균수와 유사하게 mL 당 약 7 log 의 균수가 측정되었다. 이상의 결과를

종합해 보면, *V. vulnificus* 균수 측정에 2% NaCl 이 첨가된 PBS-Na 를 희석수로 사용하였을 때가 일반 PBS 를 사용하였을 때보다 유의적으로 높은 균수가 측정되었다. 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(Randa et al., 2004; Johnson et al., 2010).

이상에서 기술한 것처럼 TCBS agar 는 *Vibrio* spp. 의 분리를 위한 선택 배지로 다른 균의 증식을 억제하는 선택성이 강하여 손상된 세포의 경우는 해당 배지에서 배양이 잘 되지 않는 것으로 판단된다(Kaysner et al., 1989; West et al., 1982, Randa et al., 2004). 본 연구에서 얻어진 결과를 종합해 보면, NaCl 이 포함된 PBS 희석수와 APW 배지를 이용한 MPN-PCR 방법이 *V. vulnificus* 균수 정량 분석에 유용한 것으로 분석되었다.

Table 3. Effect of dilution buffer and culture medium for cell count of *V. vulnificus*

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

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⁾ 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. ⁴⁾ PBS, phosphate buffer saline. 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).

2. *V. vulnificus* 균수 정량 분석 조건 검증

가. 온도 변화에 따른 균수 변화 측정

증류수, 정수기물, 수돗물 및 해수에 접종된 *V. vulnificus* 의 온도 변화에 따른 균수 분석한 결과는 Table 4., Table 5., Table 6. Table 7. 과 같았다.

증류수에 접종된 최종 균수는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 방법에서 6.72 ± 0.07 log CFU/mL 및 8.71 ± 0.40 log MPN/100mL 로 분석되었다(Table 4.). 증류수를 각 온도별로 10 분간 처리하였을 때, 0°C에서 측정된 균수는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 방법에서 1.10 ± 0.80 log CFU/mL 및 2.67 ± 0.15 log MPN/100mL 로 분석되었고, 각 정량 분석법별 균수는 5.62 log 및 6.04 log 가 감소되었다. 10°C에서의 측정 균수 결과는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 방법에서 2.22 ± 0.10 log CFU/mL 및 3.71 ± 0.53 log MPN/100mL 로 나타났으며, 균수 감소량은 4.50 log 및 5.00 log 으로 분석되었다. 25°C에서 측정된 균수는 LB-Na agar 으로 1.99 ± 0.79 log CFU/mL 로 나타나 약 4.73 log 감소하였고, MPN-PCR 방법에서 3.81 ± 0.11 log MPN/100mL 로 나타나 4.90 log 가

변화되어 측정되었다. 두 가지의 정량 분석법을 통하여 분석된 *V. vulnificus* 는 온도가 0℃일 때 25℃보다 약 1 log 가 더 감소하는 것으로 나타났으며 *V. vulnificus* 생균의 감소에 있어 온도의 영향이 있는 것으로 판단된다.

정수기물에 접종된 *V. vulnificus* 의 균수는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 방법에서 6.50 ± 0.20 log CFU/mL 및 8.91 ± 0.18 log MPN/100mL 로 분석되었다(Table 5.). 용수를 0, 10, 25℃의 온도로 10 분간 처리하였을 때, 0℃에서 측정된 균수는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 방법에서 5.98 ± 0.20 log CFU/mL 및 7.08 ± 0.40 log MPN/100mL 로 분석되었고 각 정량 분석법별 균수는 0.52 log 및 1.83 log 가 감소되었다. 10℃ 및 25℃에서의 측정 균수 측정 결과 유의적인 결과값은 나타나지 않았다.

수돗물에 접종된 최종 균수는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 방법에서 6.26 ± 0.08 log CFU/mL 및 8.85 ± 0.27 log MPN/100mL 로 분석되었다(Table 6.). 온도별로 10 분간 처리한 경우, 0℃에서 측정된 균수는 LB-Na agar 에서 6.55 ± 0.05 log CFU/mL 로 감소되지 않았고 MPN-PCR 방법을 이용하였을 때에는 7.82 ± 0.11 log MPN/100mL 로 분석되어 1.03 log 가 감소하였다. 10℃ 및

25℃에서 MPN-PCR 방법으로 측정된 균수는 $7.53 \pm 0.21 \log$ MPN/100mL 및 $7.57 \pm 0.32 \log$ MPN/100mL 로 분석되어 *V. vulnificus* 균수는 각각 1.32 log 및 1.28 log 만큼 제어된 결과를 얻을 수 있었으나, LB-Na 의 결과에서는 유의적인 결과는 나타나지 않았다.

해수에 접종된 최종 균수는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 방법에서 $6.23 \pm 0.07 \log$ CFU/mL 및 $8.82 \pm 0.31 \log$ MPN/100mL 로 분석되었고, 이를 온도별로 10 분간 처리한 후 LB-Na 와 MPN-PCR 방법으로 *V. vulnificus* 를 분석한 결과, 온도와 상관없이 유의적인 균수 변화가 나타나지 않았다(Table 7.).

이상에서 기술한 바와 같이 여러 온도로 맞춰진 염도가 다른 용수에 노출된 *V. vulnificus* 의 균수 변화를 LB-Na agar spreading 법 및 MPN-PCR 법으로 정량 분석하였을 때, 두 방법 모두 mL 당 감소 효과가 유사한 양상으로 나타나 *V. vulnificus* 균수 정량 분석에 MPN-PCR 법을 이용한 정량 분석법이 유용한 것으로 나타났다.

아울러 *V. vulnificus* 생장에 있어 염 및 온도의 영향을 받는다고 알려져 있지만(Singleton et al., 1982.; Kaspar and Tamplin,

1993), 본 연구 결과에서는 온도의 영향보다는 용수에 함유된 염의 영향이 *V. vulnificus* 생균수 변화에 크게 작용하는 것으로 판단된다.



Table 4. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in distilled water according to various quantitative cell count methods

		Medium	LB-Na	MPN-PCR
Temperature			(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with DW			6.72±0.07	8.71±0.40
0°C	VCC¹⁾		1.10±0.80	2.67±0.15
	DT²⁾		5.62±0.73 ^b	6.04±0.11 ^b
10°C	VCC		2.22±0.10	3.71±0.53
	DT		4.50±0.03 ^a	5.00±0.13 ^{ab}
25°C	VCC		1.99±0.79	3.81±0.11
	DT		4.73±0.72 ^a	4.90±0.29 ^a

¹⁾Viable cell count; ²⁾Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 5. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in purifier water according to various quantitative cell count methods

Temperature	Medium	LB-Na	MPN-PCR
		(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with PW			
0°C	VCC ¹⁾	5.98±0.20	7.08±0.40
	DT ²⁾	0.52±0.00 ^a	1.83±0.22 ^{ab}
10°C	VCC	6.37±0.26	7.62±0.42
	DT	0.13±0.06 ^a	1.29±0.24 ^b
25°C	VCC	6.84±0.03	7.59±0.35
	DT	0.34±0.17 ^a	1.32±0.17 ^b

¹⁾Viable cell count; ²⁾Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 6. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in tap water according to various quantitative cell count methods

Temperature	Medium	LB-Na	MPN-PCR
		(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with TW			
0°C	VCC ¹⁾	6.55±0.05	7.82±0.11
	DT ²⁾	-0.29±0.13 ^a	1.03±0.16 ^b
10°C	VCC	6.45±0.11	7.53±0.21
	DT	-0.19±0.19 ^a	1.32±0.06 ^b
25°C	VCC	6.81±0.03	7.57±0.32
	DT	-0.55±0.11 ^a	1.28±0.05 ^b

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 7. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in sea water according to various quantitative cell count methods

Temperature	Medium	LB-Na	MPN-PCR
		(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with SW			
0°C	VCC ¹⁾	6.18±0.14	8.75±0.57
	DT ²⁾	0.04±0.07 ^{ab}	0.07±0.26 ^{ab}
10°C	VCC	6.36±0.08	8.61±0.36
	DT	-0.13±0.15 ^a	0.21±0.05 ^b
25°C	VCC	6.69±0.04	8.63±0.29
	DT	-0.46±0.12 ^a	0.19±0.02 ^{ab}

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

나. pH 변화에 따른 균수 변화 측정

(1) 초산으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정

초산으로 pH 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0 으로 조정된 정수기물 및 수돗물에 노출된 *V. vulnificus* 균수 측정 결과는 Table 8. 및 Table 9. 와 같았다.

정수기물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 6.77 ± 0.04 log CFU/mL 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로 9.09 ± 0.17 log MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 및 5.0 에서는 두 방법 모두 *V. vulnificus* 가 검출되지 않거나 0.48 log MPN/100mL 이하로 분석되었다. pH 6.0 에서는 LB-Na agar 에서 6.35 ± 0.03 log CFU/mL 로 측정되었고, MPN-PCR 방법으로 7.86 ± 0.25 log MPN/100mL 로 측정되었다. pH 7.0 에서는 LB-Na agar 에서 6.52 ± 0.19 log CFU/mL 로, MPN-PCR 방법으로 8.15 ± 0.31 log MPN/100mL 로 분석되었다. 또한 초산으로 pH 를 조정한 정수기물에서의 *V. vulnificus* 저해 효과는 pH 4.0 및 5.0 에서 가장 높게 나타났고, pH 6.0 및 7.0 에서의 균수 감소는 유의미한 값이 아닌 것으로 사료된다.

수돗물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 6.44 ± 0.36 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로는 9.38 ± 0.38 log MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 에서 LB-Na agar 은 *V. vulnificus* 불검출, MPN-PCR 방법으로는 0.48 log MPN/100mL 이하로 분석되었고, pH 5.0 에서는 LB-Na agar 은 불검출, MPN-PCR 에서는 2.06 ± 0.29 log MPN/100mL 로 약 7.32 log 가 저해되었다. pH 6.0 에서는 LB-Na agar 에서 6.10 ± 0.06 log CFU/mL 로 측정되었고, MPN-PCR 방법으로 10.08 log MPN/100mL 이상으로 분석되었다. pH 7.0 에서는 LB-Na agar 에서 6.33 ± 0.03 log CFU/mL 로, MPN-PCR 방법으로 10.08 log MPN/100mL 이상으로 분석되었다.

Table 8. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in purifier water adjusted pH values with acetic acid according to various quantitative cell count methods

		Medium	LB-Na	MPN-PCR
			(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with PW			6.77±0.04	9.09±0.17
Acetic acid	pH 4	VCC ¹⁾	ND ¹⁾	<0.48
		DT ²⁾	6.77±0.04 ^c	>8.61
	pH 5	VCC	ND	<0.48
		DT	6.77±0.04 ^c	>8.61
	pH 6	VCC	6.35±0.03	7.86±0.25
		DT	0.42±0.01 ^a	1.23±0.08 ^b
	pH 7	VCC	6.52±0.19	8.15±0.31
		DT	0.25±0.15 ^a	0.94±0.14 ^{ab}

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 9. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in tap water adjusted pH values with acetic acid according to various quantitative cell count methods

		Medium	LB-Na	MPN-PCR
			(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with TW			6.44±0.36	9.38±0.38
pH 4	VCC ¹⁾		ND ¹⁾	<0.48
	DT ²⁾		6.44±0.36 ^b	>8.90
pH 5	VCC		ND	2.06±0.29
	DT		6.44±0.36 ^b	7.32±0.09 ^c
pH 6	VCC		6.10±0.06	>10.08
	DT		0.33±0.30 ^a	<0.70
pH 7	VCC		6.33±0.03	>10.08
	DT		0.11±0.33 ^a	<0.70

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

(2) 구연산으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정

구연산으로 pH 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0 으로 조정된 정수기물 및 수돗물에 노출된 *V. vulnificus* 균수 측정 결과는 Table 10. 및 Table 11 과 같았다.

정수기물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 6.77 ± 0.04 log CFU/mL 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로 9.09 ± 0.17 log MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 에서는 두 방법 모두 *V. vulnificus* 가 검출되지 않거나 0.48 log MPN/100mL 이하로 분석되었고 pH 5.0 에서는 LB-Na agar 에서는 불검출, MPN-PCR 방법에서는 2.32 ± 0.36 log MPN/100mL 로 6.77 log 가 감소되었다. pH 6.0 에서는 LB-Na agar 및 MPN-PCR 법 분석 결과 각각 5.82 ± 0.03 log CFU/mL 및 7.79 ± 0.26 log MPN/100mL 로 0.95 log 및 1.30 log 로 감소량은 유사하게 측정되었다. pH 7.0 에서는 각각 6.18 ± 0.23 log CFU/mL 및 8.01 ± 0.30 log MPN/100mL 로 분석되어 mL 당 감소된 log 값은 유사하게 측정되었다. 구연산으로 pH 를 조정한 정수기물에서의 *V. vulnificus* 저해 효과는 pH 4.0 에서 가장 높게 나타났고, pH 6.0 및 7.0 에서의 균수 변화는 유의미한 값이 아닌 것으로 사료된다.

수돗물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 $6.44 \pm 0.36 \log$ CFU/mL 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로는 $9.38 \pm 0.38 \log$ MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 에서 LB-Na agar 은 *V. vulnificus* 불검출, MPN-PCR 방법으로는 $0.48 \log$ MPN/100mL 이하로 분석되었고, pH 5.0 에서는 각각 $3.69 \pm 0.09 \log$ CFU/mL 및 $5.16 \pm 0.13 \log$ MPN/100mL 로 $2.75 \log$ 및 $4.22 \log$ 의 균수가 감소하여 유의적인 결과를 나타내었다. pH 6.0 및 pH 7.0 에서는 *V. vulnificus* 의 제어 효과가 나타나지 않았다. 또한 구연산으로 pH 를 조정 한 수돗물에서의 *V. vulnificus* 저해 효과는 pH 4.0 에서 가장 높게 나타났다.

Table 10. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in purifier water adjusted pH values with citric acid according to various quantitative cell count methods

Organic acid / pH	Medium	LB-Na	MPN-PCR
		(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with PW		6.77±0.04	9.09±0.17
Citric acid	pH 4	VCC ¹⁾	ND ¹⁾
		DT ²⁾	6.77±0.04 ^c
	pH 5	VCC	ND
		DT	6.77±0.04 ^c
	pH 6	VCC	5.82±0.03
		DT	0.95±0.01 ^a
	pH 7	VCC	6.18±0.23
		DT	0.59±0.19 ^a

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 11. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in tap water adjusted pH values with citric acid according to various quantitative cell count methods

Organic acid / pH	Medium	LB-Na	MPN-PCR
		(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with TW		6.44±0.36	9.38±0.38
Citric acid	pH 4	VCC ¹⁾	ND ¹⁾
		DT ²⁾	6.44±0.36 ^d
	pH 5	VCC	3.69±0.09
		DT	2.75±0.29 ^b
	pH 6	VCC	6.67±0.05
		DT	-0.23±0.41 ^a
	pH 7	VCC	6.72±0.19
		DT	-0.28±0.55 ^a

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

(3) 젖산으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정

젖산으로 pH 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0 으로 조정된 정수기물 및 수돗물에 노출된 *V. vulnificus* 균수 측정 결과는 Table 12 및 Table 13 과 같았다.

정수기물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 6.77 ± 0.04 log CFU/mL 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로 9.09 ± 0.17 log MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 에서는 두 방법 모두 *V. vulnificus* 가 검출되지 않거나 0.48 log MPN/100mL 이하로 분석되었고 pH 5.0 에서는 LB-Na agar 에서는 5.78 ± 0.18 log CFU/mL 로 0.99 log 가 감소되었고, MPN-PCR 방법에서는 5.04 ± 0.29 log MPN/100mL 로 4.05 log 가 감소되었다. pH 6.0 에서는 LB-Na agar 에서 6.15 ± 0.14 log CFU/mL 로 측정되었고, MPN-PCR 방법으로 7.87 ± 0.42 log MPN/100mL 로 측정되었다. pH 7.0 에서는 LB-Na agar 에서 6.09 ± 0.09 log CFU/mL, MPN-PCR 방법으로 7.99 ± 0.68 log MPN/100mL 로 분석되어 mL 당 log 값은 유사하게 측정되었다. 또한 젖산으로 pH 를 조정한 정수기물에서의 *V. vulnificus* 저해 효과는 pH 4.0 에서 가장 높게

나타났고, pH 6.0 및 7.0 에서의 균수 감소는 유의미한 값이 아닌 것으로 사료된다.

수돗물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 6.44 ± 0.36 log CFU/mL 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로는 9.38 ± 0.38 log MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 에서 LB-Na agar 은 *V. vulnificus* 불검출, MPN-PCR 방법으로는 0.48 log MPN/100mL 이하로 분석되었고, pH 5.0 에서는 LB-Na agar 은 2.28 ± 0.50 log CFU/mL 로 4.16 log 가 감소하였고, MPN-PCR 방법에서는 3.18 ± 0.44 log MPN/100mL 로 6.20 log 가 변화하였다. pH 6.0 및 pH 7.0 에서는 *V. vulnificus* 의 감소 효과가 나타나지 않았다. 또한 젓산으로 pH 를 조정한 수돗물에서의 *V. vulnificus* 저해 효과는 pH 4.0 에서 가장 높게 나타났다.

Table 12. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in purifier water adjusted pH values with lactic acid according to various quantitative cell count methods

Organic acid / pH		Medium	LB-Na	MPN-PCR
			(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with PW			6.77±0.04	9.09±0.17
pH 4	VCC ¹⁾		ND ¹⁾	<0.48
	DT ²⁾		6.77±0.04 ^d	>8.61
pH 5	VCC		5.78±0.18	5.04±0.29
	DT		0.99±0.14 ^a	4.05±0.12 ^c
pH 6	VCC		6.15±0.14	7.87±0.42
	DT		0.62±0.10 ^a	1.22±0.25 ^b
pH 7	VCC		6.09±0.09	7.99±0.68
	DT		0.68±0.05 ^a	1.10±0.51 ^{ab}

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 13. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in tap water adjusted pH values with lactic acid according to various quantitative cell count methods

Organic acid / pH	Medium	LB-Na	MPN-PCR
		(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with TW		6.44±0.36	9.38±0.38
pH 4	VCC ¹⁾	ND ¹⁾	0.88±0.27
	DT ²⁾	6.44±0.36 ^c	8.50±0.11 ^d
pH 5	VCC	2.28±0.50	3.18±0.44
	DT	4.16±0.14 ^b	6.20±0.06 ^c
pH 6	VCC	6.66±0.13	>10.08
	DT	-0.22±0.49 ^a	<0.70
pH 7	VCC	6.73±0.02	>10.08
	DT	-0.29±0.38 ^a	<0.70

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

(4) 레몬농축액으로 조정된 pH 에 따른 균수 변화 측정

레몬농축액으로 pH 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0 으로 조정된 정수기물 및 수돗물에 노출된 *V. vulnificus* 균수 측정 결과는 Table 14. 및 Table 15. 와 같았다.

정수기물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 6.20 ± 0.20 log CFU/mL 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로 9.09 ± 0.17 log MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 에서는 LB-Na agar 에서 불검출, MPN-PCR 방법으로 0.96 ± 0.26 log MPN/100mL 로 8.13 log 감소하였다. pH 5.0 에서는 LB-Na agar 에서 1.54 ± 0.06 log CFU/mL 로 4.66 log 감소하였고, MPN-PCR 방법으로 3.97 ± 0.34 log MPN/100mL 로 6.12 log 감소하였다. pH 6.0 및 pH 7.0 에서는 LB-Na agar 의 방법으로는 유의적인 결과가 나타나지 않았고, MPN-PCR 방법으로 7.99 ± 0.45 log MPN/100mL 및 7.78 ± 0.43 log MPN/100mL 로 각각 1.10 log 및 1.31 log 로 감소한 결과를 얻었다. 또한 레몬농축액으로 pH 를 조정한 정수기물에서의 *V. vulnificus* 저해 효과는 pH 4.0 에서 가장 높게 나타났고, pH 6.0 및 7.0 에서의 균수 감소는 유의미한 값이 아닌 것으로 사료된다.

수돗물에서의 최종 균수가 LB-Na agar 방법으로 6.20 ± 0.20 log CFU/mL 로 측정되었고 MPN-PCR 방법으로는 9.38 ± 0.38 log MPN/100mL 으로 분석되었다. pH 4.0 에서 LB-Na agar 은 *V. vulnificus* 불검출, MPN-PCR 방법으로는 0.48 log MPN/100mL 이하로 분석되었고, pH 5.0 에서는 LB-Na agar 에서 2.58 ± 0.22 log CFU/mL 로 3.62 log 감소하였고, MPN-PCR 방법으로 2.66 ± 0.39 log MPN/100mL 로 6.72 log 감소하였다. pH 6.0 및 pH 7.0 에서는 두 방법 모두 유의적인 결과가 나타나지 않았다.

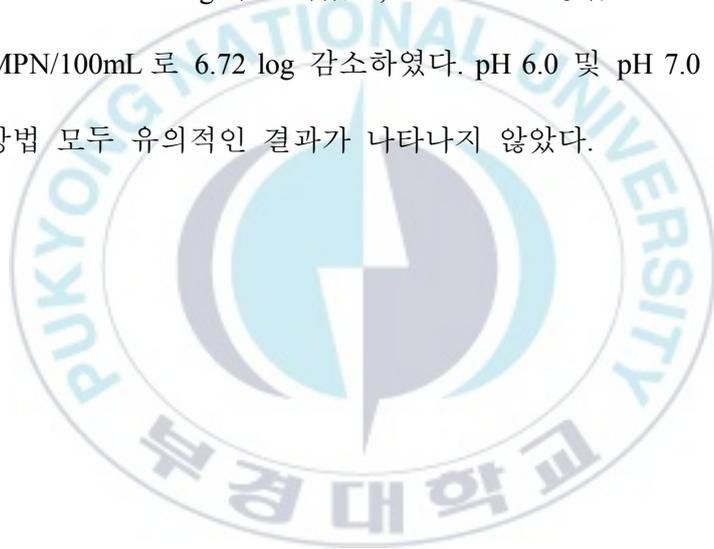


Table 14. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in purifier water adjusted pH values with lemon juice acid according to various quantitative cell count methods

		Medium	LB-Na	MPN-PCR
	Organic acid / pH	(log CFU/mL) (log MPN/100mL)		
Treatment with PW				
		6.20±0.20	9.09±0.17	
pH 4	VCC ¹⁾	ND ¹⁾	0.96±0.26	
	DT ²⁾	6.20±0.20 ^d	8.13±0.09 ^e	
pH 5	VCC	1.54±0.06	3.97±0.34	
	DT	4.66±0.14 ^c	6.12±0.17 ^d	
pH 6	VCC	6.50±0.24	7.99±0.45	
	DT	-0.30±0.44 ^a	1.10±0.32 ^b	
pH 7	VCC	6.79±0.14	7.78±0.43	
	DT	-0.59±0.34 ^a	1.31±0.26 ^b	

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 15. Changes of viable cell counts of *Vibrio vulnificus* exposed in tap water adjusted pH values with lemon juice according to various quantitative cell count methods

Organic acid / pH	Medium	LB-Na	MPN-PCR
		(log CFU/mL)	(log MPN/100mL)
Treatment with TW		6.20±0.20	9.38±0.38
pH 4	VCC ¹⁾	ND ¹⁾	<0.48
	DT ²⁾	6.20±0.20 ^c	>8.90
pH 5	VCC	2.58±0.22	2.66±0.39
	DT	3.62±0.02 ^b	6.72±0.01 ^c
pH 6	VCC	6.63±0.29	>10.08
	DT	-0.43±0.49 ^a	<0.70
pH 7	VCC	6.79±0.18	>10.08
	DT	-0.59±0.38 ^a	<0.70

¹⁾ Viable cell count; ²⁾ Difference before and after treatment; ^{a-c}, Means with different superscripts within each column indicate significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

. 요약

Vibrio vulnificus 은 해수 및 수산물에서 분리되는 그람 음성 호염성균으로, 복통, 오한 및 발열 등의 급성 위장염을 일으키며 만성질환자에게 매우 높은 치사율의 급성 패혈증을 일으키는 식중독균이다.

식품에서는 TCBS agar 등의 선택 배지로 균을 분리하거나 PCR 을 이용하여 *V. vulnificus* 을 분석하고 있으나 온도, 염 및 pH 등과 같은 환경요인에 민감한 *V. vulnificus* 의 특성을 고려하였을 때 정확한 균수 정량을 위한 정량 분석법 확립의 필요성이 요구된다. 이에 본 연구에서는 배지 및 염 차이에 따른 *V. vulnificus* 의 생육 특성 차이에 대한 연구를 진행하였다. 그 결과 *V. vulnificus* 균수 정량 분석에 APW 증균 배양을 이용한 MPN-PCR 방법이 적합하다는 결과를 얻었다.

MPN-PCR 법을 검증하기 위하여 온도, 염 및 pH 등의 여러 조건에서 기존의 미생물 정량 분석법과 MPN-PCR 을 이용한 *V. vulnificus* 정량 분석법을 비교한 결과 두 정량 분석법에서 유사한 결과를 얻을 수 있었다. *V. vulnificus* 는 생육에 있어서 0 , 15 및

25 의 온도 차이의 영향보다 염도에 의존적인 경향을 나타냈으며 특히, 염도가 0 g/L 인 증류수에 노출되었을 때 제어가 되었다. 초산, 구연산, 젖산 및 레몬농축액을 이용하여 pH 를 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0 으로 조정 한 정수기물, 수돗물에 노출된 *V. vulnificus* 는 초산이 다른 유기산보다 제어 효과가 크게 나타났다. 또한 유기산의 종류에 상관없이 pH 4.0 에서는 8 log MPN/100mL 이상 *V. vulnificus* 가 제어되었으나 pH 6.0 및 pH 7.0 에서는 제어가 되지 않는 것을 확인하였다.

본 연구에서 제시된 정량분석법은 어·패류 등의 시료에서 *V. vulnificus* 균수 정량 분석에 유용하게 사용될 것으로 기대되고 *V. vulnificus* 의 생장 및 사멸 특성을 분석하는데 유용하게 사용될 것으로 판단된다. 또한 이러한 특성을 이용하여 설정된 제어 조건은 어·패류 등의 다양한 환경에서 분리된 병원성 비브리오균의 제어에도 활용될 것으로 기대된다.

. 참고문헌

- Barrera-Escorcía G., Wong-Chang I., Fernández-Rendón C.L., Botello A.V., Gómez-Gil B., Lizárraga-Partida M.L. (2016) Quantification of *Vibrio* species in oysters from the Gulf of Mexico with two procedures based on MPN and PCR. *Environ Monit Assess*, 188, 602.
- Blanco-Abad V., Ansedo-Bermejo J., Rodríguez-Castro A., Martínez-Urtaza J. (2008) Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 129, 229–236.
- Cantet F., Hervio-Heath D., Caro A., Le Menec C., Monteil C., Quéméré C., Jolivet-Gougeon A., Colwell R.R., Monfort P. (2013) Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons *Res Microbiol.*, 164, 867-74.
- Gitika P., Douglas R.C., Melissa J.K., Asim K.B. (2004) Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7436-7444.
- Hlady W.G., Klontz K.C. (1996) The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J. Infect. Dis.*, 173, 1176-1183.
- Johnson C.N., Flowers A.R., Noriega N.F. 3rd, Zimmerman A.M., Bowers J.C., DePaola A., Grimes D.J. (2010) Relationships between

- environmental factors and pathogenic Vibrios in the Northern Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 7076-7084.
- Kaspar C.W., Tamplin M.L. (1993) Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2425-2429.
- Kaysner C.A., Tamplin M.L., Wekell M.M., Stott R.F., Colburn K.G. (1989) 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.
- Kim T.O. and Park K.S. (2014) Quantification of *Vibrio parahaemolyticus* Using a Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction Assay Targeting the H-NS gene, *Kor J Fish Aquat Sci* 47(5), 556-561
- Klontz K.C., Lieb S., Schreiber M., Janowski H.T., Baldy L.M., Gunn R.A. (1988) Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Ann. Intern. Med.*, 109, 318-323.
- Mahmud Z.H., Neogi S.B., Kassu A., Mai Huong B.T., Jahid I.K., Islam M.S., Ota F. (2008) Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 64, 209-218.

- Motes M.L., DePaola A., Cook D.W., Veazey J.E., Hunsucker J.C., Garthright W.E., Blodgett R.J., Chirtel S.J. (1998) Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). Appl. Environ. Microbiol., 64, 1459-1465.
- Muhammad J.A., Ken-Ichi T., Shin-Ichi M., Sumio S. (2002) Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan, FEMS Microbiol., 208, 83-87,
- Nandi, B., Nandy, R. K., Mukhopadhyay, S., Nair, G. B., Shimada, T. and Ghose, A. C. (2000) Rapid Method for Species-Specific Identification of *Vibrio cholerae* Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein OmpW. Journal of Clinical Microbiology 38: 4145-4151
- Oliver J.D. (2005) Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. Epidemiol. Infect., 133, 383-391.
- Randa M.A., Polz M.F., Lim E. (2004) Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. Appl. Environ. Microbiol., 70, 5469-5476.
- Rudi K., Moen B., Drømtorp S.M., Holck A.L. (2005) Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and

dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1018–1024.

Singleton F.L., Attwell R., Jangi S. AND Colwell R. R. (1982) Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio cholerae* Growth, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(5), 1047-1058

Strom M.S., Paranjpye R.N. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect.*, 2, 177-188.

Ubong, A., Tunung, R., Noorlis, A., Elexson, N., Tuan Zainazor, T. C., Ghazali, F. M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. (2011) Prevalence and detection of *Vibrio* spp. and *Vibrio cholerae* in fruit juices and flavored drinks, *International Food Research Journal* 18(3), 1163-1169

West P.A., Russek E., Brayton P.R., Colwell R.R. (1982) 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.