

Long-Term Starvation Induces the Viable-but-Nonculturable
Condition in *Lactobacillus crispatus* KLB46

이석용, 김주현, 장정은, 김승철¹, 유현식, 소제성

인하대학교 생물공학과 초정밀생물분리기술연구센터, ¹이화여대 의과대학 산부인과학교실
전화 (032)860-7516, FAX (032)875-0827

ABSTRACT

In a previous study, we have isolated a number of lactobacilli from Korean women, and one of them (KLB46) was identified as *Lactobacillus crispatus* by 16S rRNA gene sequencing. For the ecological treatment of bacterial vaginosis (BV) cell suspension of *L. crispatus* KLB46 was instilled into BV patients. *L. crispatus* KLB46 was found to persist for several days in cell suspension with no nutrients. In this study, in order to assess the influence of starvation on physiological activity, we compared the viability and culturability of KLB46 following suspension in various buffer solutions. A pair of in situ fluorescent dye was used to assess viability (i.e. membrane integrity) and the culturability was examined by plate count assay. A rapid epifluorescence staining method using the LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit (*BacLight*TM) was applied to estimate both viable and total counts of bacteria in cell suspension. *BacLight*TM is composed of two nucleic acid-binding stains (SYTO 9TM and propidium iodide). SYTO 9TM penetrates all bacterial membranes and stains the cells green while propidium iodide only penetrates cells with damaged membranes, therefore the combination of the two stains produces red fluorescing cells. Optimal staining conditions for *BacLight*TM were found to be with 0.0835M SYTO 9TM and 0.05M propidium iodide for 15 min incubation at room temperature in dark. When cells were microscopically examined during 140 hours of starvation, the culturability decreased markedly while the viability remained relatively constant, which suggests that large fraction of KLB46 cells became viable but non-culturable (VBNC) upon starvation.

INTRODUCTION

건강한 여성의 질 내부에는 여러 가지 정상미생물이 서식하고 있고 이 미생물들은 질의 건강에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 이 미생물 중에서 가장 많은 점유율을 보이는 것이 유산간균(*Lactobacillus*) 종류이다. 유산간균들은 질 내에 다른 병원성균주들의 침입을 방해하는 역할을 수행하기도 하는데 이때 이들은 산, H₂O₂, 항균펩티드 등의 항균물질을 분비한다. 흔히 질염에 감염된 환자들을 살펴 보게 되면 이러한 유산간균의 수가 줄어들고 대신 병원성균주로 우점균총이 바뀐 것을 볼 수 있다²⁾. 이러한 상황에서 지금까지의 질염 치료방법인 항생제 처리를 하게 되면 병원성 균주에게 타격을 주는 것은 물론 유익한 유산간균들도 항생제의 영향을 받게 되고 결국 정상세균총이 복구되지 못하여 치료가 된다 하더라도 얼마 지나지 않아 질염이 재발하게 된다. 우리는 질염치료에서 이러한 항생제 처리를 대체하기 위한 방법으로 정상세균총을 복구시키는 생태적방법을 연구하였고, 이를 위하여 정상세균총으로 기능을 할 수 있는 강한 항균활성을 보이는 균주들을 한국여성으로부터 분리 하였다³⁾. 이러한 균주들 중 가장 우수한 균주로 *Lactobacillus crispatus* KLB46이 선별되었고 이 균주를 이용한 생균제제의 개발을 위한 연구를 수행하고 있다. 본 연구에서는 생균제제의 효과를 확인하기 위한 임상실험의 진행과 임상실험에 쓰이는 균현탁액의 운반 및 보관 과정 중에서 균주의 생존력을 측정하는 실험을 수행하였고, 실험을 수행하는 과정에서 특이한 현상, 즉 죽지 않았지만 배양 불가능한 상태(VBNC, viable but non-culturable)로 균주가 바뀌는 것을 확인할 수 있었다⁴⁾. 이러한 VBNC 상태로 바뀌는 요인은 크게 starvation 과 cold shock으로 추정되는데, 이번 연구에서는 starvation 과 cold shock을 주었을 때 여러 가지 buffer 현탁액에서 균의 성장능(culturability)과 생존능(viability)이 얼마나 차이를 보이는지 정량적으로 측정하였다.

MATERIALS AND METHODS

균주 및 배양조건. 한국여성에게서 분리한 균주중에서 가장 항균활성이 뛰어난 균주를 선별하였고 이를 16S rRNA sequencing을 통하여 *Lactobacillus crispatus*임을 밝혔다. -70°C에 보관되어 있던 균주를 500ml MRS broth에 1% 접종하여 12시간 배양한후 원심분리기를 이용하여 수거한 후 멸균증류수로 세척한다. 이를 각각의 용액에 현탁시키게 되는데 여기에는 8 mM sucrose, Phosphate buffer, normal saline, ddH₂O 등의 용액을 사용하였다. 각각의 균주현탁액들은 각각 1ml씩 분주하여 4°C의 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다.

생장능(culturability) 및 총균수 측정. 생육 가능한 균체수 측정은 MRS agar spot counting 방법을 이용하였다. Spot counting 방법은 MRS agar plate에 10배 단위로 희석된 균 현탁액을 5 μ l씩 spot 하여 배양하고 여기에서 나온 colony수를 측정하여 계수하는 방법이다. 또한 총균수 측정을 위하여 적절히 희석된 현탁액을 Hcmacytometer와 현미경을 이용하여 직접 계수하는 방법이다.

Membrane integrity 측정(viability). 생균수 측정은 LIVE/DEAD BacLight™ viability kit (Molecular Probes, Oregon, USA)를 사용하여 측정하였는데 여기에는 두가지 DNA staining dye가 첨가되어 있다. 먼저 SYTO 9™은 모든 cell의 membrane을 통과하여 DNA에 결합하는 staining dye이고 녹색으로 보인다. 여기에 propidium iodide를 같이 사용하게 되면 propidium iodide는 damage를 입은 membrane를 선택적으로 통과하기 때문에 죽어있는 cell만이 propidium iodide에 염색되게 된다. propidium iodide가 염색되게 되면 SYTO 9™의 녹색은 붉은빛으로 변하게 된다. 즉 두가지 dye를 동시에 사용하게 되면 살아있는 cell(막의 활성을 유지하고 있는 cell)은 녹색으로 죽어있는 cell은 붉은색으로 보이게 된다⁵⁾. 염색조건은 0.0835M의 SYTO 9™, 0.05M의 propidium iodide를 첨가하고 15분동안 암소에서 실온배양하는 것이 최적임을 확인하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of starvation on growth-dependent assays. 두 가지 실험 - Total cell counting, Plate spot counting - 을 수행하였고 상이한 결과를 얻을 수 있었다. Total counting에서는 균체수가 거의 감소하지 않았지만 Plate spot counting에서는 눈에 띄는 감소를 보였다 (Fig. 1).

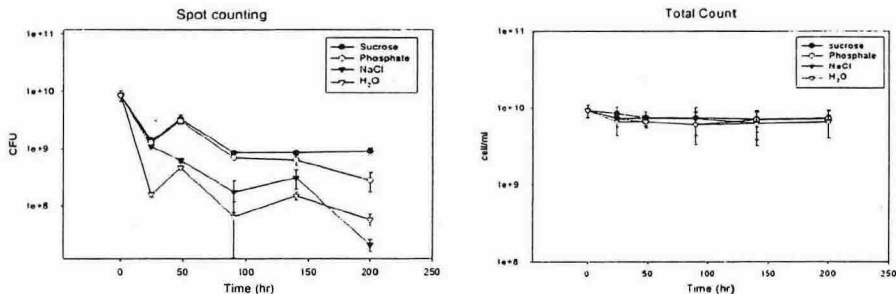


Figure 1. Culturable cell and total cell count of various cell suspension. Results are shown for cultures

suspended in 8mM sucrose(●), Phosphate buffer(○), normal saline(▼) and ddH₂O(▽)

Plate spot counting에서는 여러 가지 용액이 사용되었는데 여기서 가장 좋은 culturability를 보인 용액은 8 mM의 sucrose 용액이다. 이는 다른 normal saline이나 ddH₂O보다 약 10배 이상의 culturability 보존능력을 보이고 Phosphate buffer보다 2배 가까운 보존능력을 보였다. 이전 실험에서 이외의 다른 용액과의 비교실험도 수행되었고 이때도 역시 sucrose는 가장 좋은 보존능력을 보였다.

Effects of starvation on membrane integrity(viability). Viability를 측정하기 위해 사용된 LIVE/DEAD *Bac*-Light assay에서 특이한 결과를 얻을 수 있었는데 이는 culturability의 감소와 같은 정도의 viability의 감소가 일어나지 않았다는 것이다. 4가지 용액에서 모두 viability의 감소를 보였는데 culturability의 감소폭인 1/10~1/100보다 매우 적은 정도의 감소를 보였다(Fig.2). 특히 1/100에 가까운 culturability 감소폭을 보인 Normal saline과 ddH₂O가 약 40~50%의 viability 감소폭을 보이는 것을 볼 때 살아있지만 배양 불가능한 상태(VBNC, Viable But Non-Culturable)로 전환된 cell이 많은 수 존재한다고 추정할 수 있다.

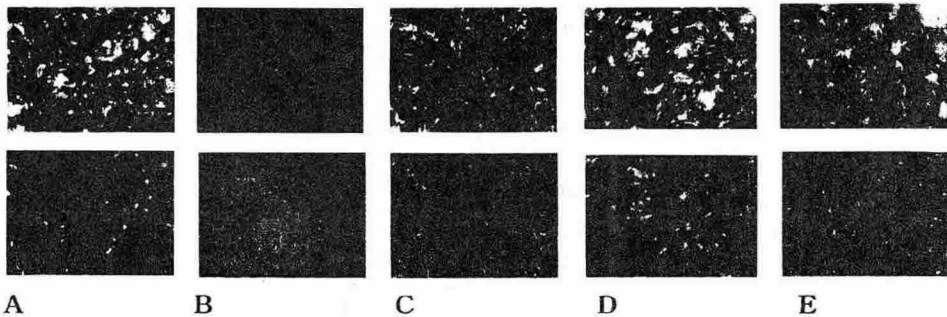


Fig. 2 *칸주*의 Live/Dead staining 사진

upper panels, N2.1 filter; lower panels, I3 filter, $\times 1000$

A, 0 hour ; B, 140 hour H₂O ; C, 140 hour Normal saline ;

D, 140 hour Phosphate buffer ; E, 140 hour 0.008M sucrose

초기 *칸주*의 staining 사진(A)을 보면 대부분의 cell이 녹색을 보인다. 이는 전체 cell중 92%의 cell이 viability를 가지고 있다고 측정되었다. 하지만 140시간이 지난 후의 사진을 보게 되면 ddH₂O(B), Normal saline(C)은 각각 54%와 62%의 viability를 보이지만 Phosphate buffer(D)와 8 mM sucrose(E)는 각각 87%와 92%의 viability를 나타내었다. 이상의 현미경 관찰결과를 정량적으로 요약하였다 (Table 1).

Solution	8 mM Sucrose	Phosphate buffer	Normal saline	ddH ₂ O
culturability	10.02%	7.49%	3.65%	1.49%
viability	92%	87%	62%	54%
difference	81.98%	79.51%	58.35%	52.51%

Table 1. Quantitative comparison between culturability and viability of 140hr starved cells.

Viability와 Culturability를 비교하여 그 차이를 VBNC 상태로 전환된 균체수를 추정한다면 sucrose, Phosphate buffer, normal saline, ddH₂O 상에서 각각 81.98%, 79.51%, 58.35%, 52.51%의 cell이 VBNC상태로 전환되었다고 볼 수 있다. 또한 생존능을 가지고 있는 전체 cell중에서 배양가능한 cell이 각각 10.89%, 8.6%, 5.88%, 2.75%임을 알 수 있었다⁶⁾. Starvation 및 cold shock에 의해서 많은 수의 균체가 VBNC상태로 전환되지만 첨가해주는 물질에 따라서 균체가 VBNC상태로 유도되는 것이 조절되는 현상을 확인하였다.

ACKNOWLEDGEMENT

본 연구는 인하대 초정밀생물분리기술연구센터(BSEP)의 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

1. Eschenbach, D. A., P. R. Davik, B. L. Williams, S. J. Klebanoff, K. Young-Smith, C. M. Critchlow, and K. K. Holmes. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 27, 251 (1989)
2. Sobel, J.D. Vaginal infections in adult women, *Medical Clinics of North America*, 74, 1573 (1990).
3. Bruce, A.W., and G. Reid. Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections, *Can. J. Microbiol.* 34, 339 (1988).
4. Alexander, E., Dat Pham, and T. R. Steck. The Viable-but-Nonculturable Condition Is Induced by Copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3754 (1999).
5. Pettipher, G. L.. Rapid Membrane Filtration-Epifluorescent Microscopy Technique for Direct Enumeration of Bacteria in Raw Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 423 (1980).
6. Kell, D. B., A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood and M. R. Barer. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 169 (1998).