

# MPN 및 H-NS 유전자를 표적으로 하는 PCR assay를 병용한 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)의 정량

김태옥 · 박권삼\*

군산대학교 식품생명공학과

## Quantification of *Vibrio parahaemolyticus* Using a Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction Assay Targeting the H-NS gene

Tae-Ok Kim and Kwon-Sam Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

We applied a combination of most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR) methods using a PCR procedure targeting the H-NS (VP1133) gene to detect *Vibrio parahaemolyticus* presence and density in seawater as well as within short-necked clam *Ruditapes philippinarum* tissues collected from Gomsu Bay, Korea. In 30 seawater samples, *V. parahaemolyticus* levels ranged from less than 1.8 to  $1.1 \times 10^3$  MPN/100 mL, and samples from August showed higher than those from other months. Furthermore, the levels of *V. parahaemolyticus* in six short-necked clam samples ranged from  $7.8 \times 10^2$  to  $2.1 \times 10^3$  MPN/100 g, approximately 2.5 times higher than in seawater samples from the corresponding month. Our results provide data on *V. parahaemolyticus* contamination in seawater and short-necked clam tissues, and help to improve quantitative methods of assessing *V. parahaemolyticus* levels.

Key words: H-NS gene, Most probable number, Polymerase chain reaction, *Vibrio parahaemolyticus*

### 서 론

장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)는 저도 호염성 해양 세균으로 이 균에 오염된 어패류 또는 불충분하게 가열 처리된 수산물을 생식함으로써 설사, 복통, 구토, 오한 및 미열 등을 동반하는 급성위장염 증상을 일으키며 심한 경우에는 사망에 이르게 하는 식중독 세균이다(Sakazaki et al., 1968; Blake et al., 1980; Honda and Iida, 1993). 일반적으로 해수 및 어패류 등의 자연계에서 분리된 대부분의 장염비브리오는 병원성 유전자를 보유하지 않는 비병원성 균주인 반면 부적절한 수산물을 섭취하여 급성위장염 증상을 나타내는 환자의 가검물에서 분리한 장염비브리오의 97% 이상은 이 균의 대표적인 병원성 인자인 내열성용혈독(thermostable direct hemolysin, TDH) 또는 내열성용혈독 관련용혈독(TDH-related hemolysin, TRH) 유전자를 보유하고 있다(Shirai et al., 1990; Honda and Iida, 1993).

식품의약품안전처의 식중독 통계시스템 자료에 의하면 2002년부터 2013년까지 12년간 우리나라에서 발생한 장염비브리

오에 의한 식중독 사고는 주로 여름철에 집중적으로 발생하며 사고건수 및 환자수는 전체 세균성 식중독 사고의 16.5% 및 8.2%를 차지하고 있다(MFDS, 2014). 사고건수로는 병원성대장균, 살모넬라에 이어 3위에 환자수로는 병원성대장균, 황색포도상구균, 살모넬라에 이어 4위를 차지하고 있기 때문에 수산물의 안전성 확보는 국민보건위생상 매우 중요하다(MFDS, 2014). 해수에서 장염비브리오의 존재는 수온과 밀접하여 수온이 17°C 이상으로 상승하는 하절기에는 자유 유행의 형태로 해수에서 쉽게 검출되나 수온이 10°C 이하로 낮아지면 검출빈도는 급격히 떨어지며 동절기에는 저질 또는 동물성 플랑크톤의 키틴질 등에 부착하여 월동한다고 보고되어 있으나 상세한 내용에 대해서는 아직 규명되어 있지 않다(Kaneko and Colwell, 1975; Makino et al., 2003). 장염비브리오는 최적의 조건에서 균의 세대시간이 8-12분 정도로 어느 세균보다도 빨라 단시간(3-4시간)에 식중독을 일으킬 수 있는 균수에 도달할 수 있기 때문에 장염비브리오에 의한 식중독 사고 예방을 위해서는 신속 검출이 매우 중요하다(Makino et al., 2003). 수산물로부터 장염

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0556>



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.

Kor J Fish Aquat Sci 47(5) 556-561, October 2014

Received 26 September 2014; Revised 7 October 2014; Accepted 8 October 2014

\*Corresponding author: Tel: +82. 63-469-1822 Fax: +82. 63-469-7448

E-mail address: parkks@kunsan.ac.kr

비브리오의 검출방법에는 PCR assay, most probable number (MPN) (Copin et al., 2012), DNA hybridization (Wang et al., 2011), Chromogenic agar (Su et al., 2005)를 이용하는 방법들이 보고되어 있으나 이중에서 PCR assay는 다른 방법에 비해 신속하며 검출한계가 뛰어난 점 등의 장점으로 인하여 많이 이용되고 있다(Kim et al., 1999; Kim et al., 2008; Yu et al., 2010). 지금까지 PCR assay에 사용된 장염비브리오의 표적 유전자로는 *tdh*, *tth*, *toxR*, *rpoS*, *irgB* 및 *gyrB* 등이 있으나 거짓 양성 또는 거짓 음성 반응 등의 문제점을 내포하고 있다(Venkateswaran et al., 1998; Bej et al., 1999; Kim et al., 1999; Yu et al., 2010).

H-NS (histone-like nucleoid structuring) 단백질은 저분자 물질로 AT-rich DNA에 결합하여 병원성 유전자를 포함한 다수 유전자의 전사를 양성 또는 음성적으로 조절하는 전사조절 인자로 알려져 있으며 병원성대장균, 살모넬라, *V. cholerae* 등 다수의 병원성 세균에서 보고되어 있다(Fang and Rimsky, 2008). 2003년 장염비브리오 RIMD2210633 균주의 염색체 DNA 염기서열 해독결과 큰 염색체에 H-NS (VP1133) 유전자의 존재가 밝혀졌으며(Makino et al., 2003), 그 유전자의 DIG-labeling probe를 사용한 dot-blot hybridization법으로 임상 및 환경유래 장염비브리오 46종을 대상으로 유전자 존재여부를 검토한 결과 실험에 제공된 모든 균주에서 H-NS 유전자의 존재가 확인되어 장염비브리오 동정을 위한 표적유전자로서의 가능성이 시사되었다(Park et al., 2005). No et al. (2011)는 장염비브리오의 신속 동정을 위한 PCR assay의 표적유전자로 H-NS 유전자의 타당성을 검토한 결과 이 유전자는 다수 비브리오속의 종에서 장염비브리오에서만 특이성이 확인되어 H-NS 유전자는 장염비브리오의 신속판정 및 동정을 위한 유전자로서의 유용성을 보고하였다.

본 논문은 해수 또는 수산물에 존재하는 장염비브리오의 정량을 위하여 most probable number (MPN)와 H-NS 유전자를 표

적으로 하는 PCR assay 방법을 병행하여 해수 및 바지락 중의 장염비브리오 농도를 정량하는 조건을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시료채취 지점 및 시료채취

해수 및 바지락 시료의 채취지점은 Fig. 1에 제시하였다. 해수는 2013년 6월부터 11월까지 전라북도 고평만 해역 5곳의 조사지점에서 매월 1회씩 총 6회에 걸쳐 채취하였으며, 바지락은 3곳의 조사지점에서 2013년 7월과 8월 총 2회 채취하였다. 해수채취는 만조 시 각 조사지점에서 표층용 채수기를 사용하여 멸균된 250 mL 광구병에 직접 채취하였으며, 바지락은 간조 시 각 조사지점에서 채취도구를 사용하여 직접 채취하였다. 채취한 해수 및 바지락 시료는 얼음이 채워진 아이스박스에 넣어 10℃ 이하로 유지하여 실험실로 운반한 후 미생물시험을 실시하였다. 해수의 수온, pH, 염분 및 용존산소는 수질분석기(YSI556 multiprobe system; Yellow Springs, YSI Life Science, OH, USA)를 사용하여 현장에서 측정하였다.

### 균수 조정

PCR assay에 의한 장염비브리오의 최소 검출농도를 측정하기 위하여 3% sodium chloride이 첨가된 Luria-Bertani (1% tryptone, 0.5% yeast-extract, 3% NaCl) broth에서 하룻밤 배양한 장염비브리오 RIMD2210633 균주를 원심 분리(12,000 rpm, 2 min)하여 집균하였다. 여기에 1.0 mL의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)를 가하여 현탁 후 원심 분리하여 PBS로 재차 현탁 하였다. 균수 측정은 현탁액 10 µL를 counting chamber (Paul Marienfeld GmbH&Co, KG Lauda-Konigshofen, Germany)에 넣고 광학현미경(Olympus CX31RBSF, Olympus Optical Co., LTD. Tokyo, Japan)하에서 균수를 직접 계측하여 계산하였으며 적절한 농도까지 10진법으로 희석하여 PCR assay에 사용하였다.

### 장염비브리오의 정량시험

해수 및 패류시료 중의 장염비브리오 정량을 위해 Recommended Procedures for the Sea Water and Shellfish (APHA, 1970)에 준하여 시험하였다. 해수는 최종농도 2%의 sodium chloride이 첨가된 alkaline peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) 10 mL에 3개 시험관법으로 10, 1, 0.1 및 0.01 mL씩 접종한 후 35℃에서 16시간 정치 배양하였다. 또한 바지락은 무균적으로 탈각 후 육 25 g을 멸균된 Waring Blender cup (Torrington, USA)에 넣고 여기에 9배 량의 멸균인산완충희석액(phosphate buffered saline, pH7.4)을 첨가하여 90초 동안 균질화한 다음 10진법으로 적절한 단계까지 희석하여 해수와 동일하게 3개 시험관법으로 접종한 후 35℃에서 16시간 정치 배양하였다. 각 배양액 1.0 mL를 eppendorf tube에 취해 원심분리



Fig. 1. Location of sample collection stations in Gomso Bay from June to November 2013. ○, seawater sampling stations; ●, short-necked clam sampling stations.

(12,000 rpm, 2 min)한 후 배양액은 완전히 제거하여 균체를 회수하였다. 여기에 멸균 증류수 0.2 mL를 가하여 현탁 후 98°C에서 5분간 열처리 후 H-NS 유전자 증폭을 위한 PCR assay용 주형 DNA로 사용하였다. H-NS 유전자의 증폭산물이 확인된 시험관은 양성으로 판정하여 최확수(most probable number, MPN)에 적용하여 100 mL 또는 100 g 중에 존재하는 장염비브리오의 균수로 계산하였다.

### PCR assay 조건

유전자 증폭에는 EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara, Japan)를 사용하였다. *hns* 및 *toxR* 프라이머의 최종농도는 반응액에 각각 2.0 pmol이 되도록 조정하였으며, 반응액은 총 50 µL가 되도록 하였다. PCR 조건은 95°C에서 1회 3분간 열 변성 후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초를 한 단위로 하여 이를 30회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4, Marne-la-Vallee, France) 사 Gel-Doc system으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### PCR assay에 의한 장염비브리오의 검출 최소농도의 검토

PCR assay에 의한 장염비브리오의 검출한계에 관한 보고는 다수 존재한다. 염색체 DNA를 주형으로 *groEL* 유전자를 표적으로 한 경우, PCR assay에 의한 검출한계 농도는 100 pg 이라고 보고하고 있으며(Hossain et al., 2011), H-NS 유전자를 표적으로 하는 PCR assay에 의한 검출한계 농도는 0.14 pg 이라고 보고하고 있으며(No et al., 2011), O-serogroup을 표적으로 한 PCR assay에 의한 검출 최소농도는 1.0 ng 이라고 보고하고 있다(Chen et al., 2012). 또한 균체를 주형으로 PCR assay에 의한 검출 최소 균수는 10 colony forming unit (CFU) 였다고 보고되어 있다(Wei et al., 2014).

H-NS 유전자를 표적으로 하는 PCR assay에 의한 장염비브리오 균체의 검출 최소농도를 검토하기 위하여 균체 농도를 반응액에  $0.8 \times 10^4$  CFU에서  $0.8 \times 10^0$  CFU 농도가 되도록 조정하여 첨가하였다. Fig. 2에 제시한 바와 같이 H-NS 유전자의 증폭은  $0.8 \times 10^0$  CFU 농도에서는 DNA의 증폭산물이 확인되지 않았지만 나머지  $0.8 \times 10^4$  CFU에서  $0.8 \times 10^1$  CFU까지 농도

에서는 예상 증폭 단편인 465 bp의 DNA 증폭산물이 확인되었다. 그러나  $0.8 \times 10^1$  CFU 농도의 반응구에서는 다른 농도에 비해 DNA 밴드는 미약하게 나타났다. 또한 *toxR* 프라이머에 의한 PCR assay 결과도 H-NS와 동일하게 확인되었다(자료미제시). 결론적으로 PCR assay를 위한 반응액 중의 장염비브리오 농도가 8 CFU 이상이면 검출은 가능하다고 판단되는 결과이며 이는 기존의 보고와 유사한 결과이다(Wei et al., 2014). 장염비브리오는 세대시간이 어느 세균보다 빠르고 최소 검출한계의 균 농도가 8 CFU 이상이면 검출이 가능하기 때문에 적절한 배지를 이용하여 매우 짧은 시간 증균 하여도 장염비브리오 검출에는 문제는 없을 것으로 판단된다.

### 해수 중의 장염비브리오 정량

전라북도 부안군 곰소만 표층 해수 중의 장염비브리오 농도를 측정하기 위하여 최확수법과 H-NS 유전자의 primer set를 사용한 PCR assay의 병용에 의해 2013년 6월부터 11월까지 6개월 동안 총 30개의 해수 시료를 대상으로 장염비브리오의 농도를 측정하였다. 각 해수 시료의 온도, 염분, pH 및 용존산소에 대한 측정치는 Table 2에 제시하였다. 수온은 6월에 21-23°C 였으나 점점 상승하여 8월에는 30°C 전후로 가장 높게 측정되었으며 이후 점차 하락하여 11월에는 15-16°C 전후로 측정되었다. 염분과 pH는 월별에 따른 차이는 거의 나타나지 않는 안정한 값을 나타내었으며, 용존산소는 수온이 높은 8월이 다른 월에 비해 가장 낮게 측정되었다. 해수 채취지점이 곰소만으로 한정되어 있기 때문에 정점에 따른 수온, 염분, pH 및 용존산소 등의 수

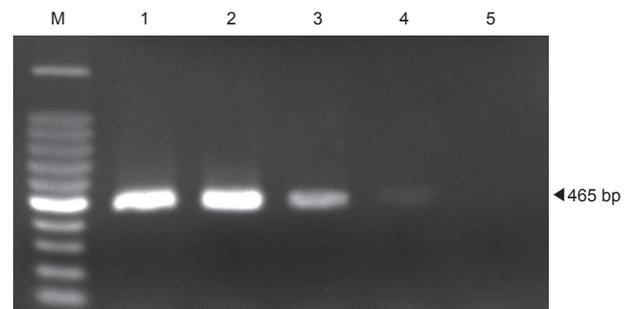


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified in PCR assay using *hns* primers. M, 100 bp ladder marker (Takara, Japan); lane 1,  $0.8 \times 10^4$  CFU; lane 2,  $0.8 \times 10^5$  CFU; lane 3,  $0.8 \times 10^2$  CFU; lane 4,  $0.8 \times 10^1$  CFU; lane 5,  $0.8 \times 10^0$  CFU.

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Oligonucleotide sequence	Amplicon size (bp)	Reference
<i>toxR</i> (VP0820)	5' -AGCCCGCTTTCTTCAGACTC-3' 5' -AACGAGTCTTCTGCATGGTG-3'	399	Kim et al., 1999
<i>hns</i> (VP1133)	5' -AAACACGTTAACCTATTAATAGG-3' 5' -AACGGGAGCCCTTTTAAACAAGA-3'	465	No et al., 2011

치는 거의 차이가 없는 것으로 파악되었다. 장염비브리오의 농도는 수온이 21-23°C 전후인 6월의 경우 20-78 MPN/100 mL (평균 48.4 MPN/100 mL), 7월에는 200-780 MPN/100 mL (평균 472 MPN/100 mL), 8월에는 780-1,100 MPN/100 mL (평균 972 MPN/100 mL), 9월에는 110-170 MPN/100 mL (평균 134 MPN/100 mL), 10월에는 11-46 MPN/100 mL (평균 27 MPN/100 mL), 11월에는 <1.8-2.0 MPN/100 mL (평균 1.9 MPN/100 mL)로 측정되었다. 곰소만 해수 중의 장염비브리오 농도는 수온이 가장 높은 8월에 가장 높게 측정되었으며 수온

저하와 동반하여 장염비브리오의 농도도 낮아지는 것으로 확인되었다. DePaola et al. (1990)은 미국 연안 해수 중의 장염비브리오 농도는 17 CFU/100 mL이며, 다른 요인보다 수온이 장염비브리오 농도 형성에 가장 밀접하게 작용한다고 보고하고 있다. 또한 Cantet et al. (2013)은 프랑스 지중해 연안 해수 중의 장염비브리오 농도는 1.0에서  $>1.1 \times 10^2$  MPN/100 mL로 측정되었다는 보고도 있는데 이 결과는 곰소만 해수보다 약 10배 정도 낮은 수치이다. Table 2의 결과를 종합해 보면 해수 중의 염분, pH 및 용존산소와 장염비브리오의 검출농도와는 상관관계

Table 2. Levels of *Vibrio parahaemolyticus* in surface seawater in Gomso Bay from June to November 2013

Month	St.	Temp. (°C)	Sal. (ppm)	pH	DO (mg/L)	<i>V. parahaemolyticus</i> (MPN/100 mL)
June	W-1	21.85	30.23	8.08	7.55	78
	W-2	21.29	30.55	8.13	8.14	46
	W-3	21.20	30.54	8.12	8.34	20
	W-4	23.31	29.71	8.04	7.56	20
	W-5	22.22	30.15	8.08	7.86	78
July	W-1	26.87	29.29	7.73	6.53	460
	W-2	24.99	29.48	7.72	6.06	780
	W-3	25.06	29.06	7.75	6.52	200
	W-4	25.94	29.42	7.73	6.54	460
	W-5	26.75	29.72	7.68	6.52	460
Aug.	W-1	30.28	30.71	7.88	5.84	780
	W-2	29.24	30.84	7.86	5.52	1,100
	W-3	29.48	30.46	7.88	5.57	780
	W-4	30.11	30.28	7.87	6.38	1,100
	W-5	29.51	30.20	7.86	5.18	1,100
Sep.	W-1	22.91	30.19	7.72	6.16	110
	W-2	22.98	30.34	7.73	6.62	110
	W-3	23.15	30.22	7.74	6.69	170
	W-4	24.18	30.85	7.73	6.23	140
	W-5	23.27	30.61	7.78	6.18	140
Oct.	W-1	20.52	29.60	7.89	6.76	46
	W-2	20.38	29.55	7.96	7.35	11
	W-3	20.30	29.56	7.94	7.31	46
	W-4	20.84	29.50	7.85	6.94	20
	W-5	20.54	29.27	7.90	7.27	11
Nov.	W-1	15.97	30.52	8.09	6.03	<1.8
	W-2	16.22	30.56	7.99	6.18	2.0
	W-3	16.14	30.64	8.03	6.14	2.0
	W-4	15.19	30.15	8.07	6.03	<1.8
	W-5	15.63	30.43	8.07	6.01	<1.8
Total		15.19~30.28	29.06~30.85	7.68~8.13	5.18~8.34	<1.8~1,100

St., Station; Temp., Temperature; Sal., Salinity; DO., Dissolved oxygen.

는 희박하였다. 또한 해수채취 지점에 따른 장염비브리오 농도에는 약간의 차이는 있었지만 대체로 안정적으로 분포하고 있었다. 결론적으로 해수에서 장염비브리오의 검출농도는 해수의 온도와 상관관계가 가장 밀접하여 해수의 온도가 높아질수록 장염비브리오 농도는 높아지고 수온이 낮아지면 장염비브리오의 농도도 함께 낮아지는 것으로 확인되었다. 수온이 16°C 이하인 11월의 경우에는 장염비브리오의 검출은 거의 확인되지 않았으며 이는 기존의 보고와 거의 동일한 결과이다(Kaneko and Colwell, 1975).

### 바지락 중의 장염비브리오 정량

곰소만에서 생산되는 패류종인 바지락 중의 장염비브리오 농도를 측정하기 위하여 2013년 7월과 8월 2개월간 Fig. 1에 제시한 지점에서 바지락을 채취하여 총 6점의 바지락에 대해 장염비브리오의 농도를 MPN-PCR assay를 병행하여 측정하였다. 그 결과 7월의 경우, 장염비브리오는 780-1,700 MPN/100 g (평균 1,193 MPN/100 g) 이었으며, 8월 시료에서는 1,700-2,100 MPN/100 g (평균 1,967 MPN/100 g)로 측정되었다. 8월 바지락이 7월 바지락보다 평균 약 1.8배 정도의 높은 농도의 장염비브리오가 검출되었는데 이는 수온상승에 의하여 해수 중의 장염비브리오의 농도가 높았기 때문인 것으로 판단된다. 동일시점의 해수와 바지락에 존재하는 장염비브리오의 농도를 비교해보면 7월 시료의 경우, 바지락이 해수보다 약 2.5배 정도 장염비브리오의 농도가 높았으며, 8월 시료에서도 바지락이 해수보다 약 2.45배 정도 높은 것으로 확인되었다. 결과적으로 해수보다 바지락에 약 2.5배 정도 높은 농도로 장염비브리오가 존재하는데 이는 바지락의 먹이섭취 방식인 여과섭식 때문에 바지락 체내에 장염비브리오의 축적이 용이하였거나 또는 바지락의 생활환경인 저질이 해수보다 영양성분이 많아 장염비브리오 증식에 유리하게 작용하였을 가능성이 제기된다. DePaola et al. (1990)는 동일 장소에서 채취한 굴 중의 장염비브리오 농도가 해수보다 100배 높았다는 보고가 있으나 본 연구의 결과와는 매우 다른 결과이다. 따라서 수온이 상승하는 하절기에는 해수

및 수산물에 높은 농도로 장염비브리오가 존재하고 있다는 점에서 장염비브리오 유래 식중독 사고의 예방을 위하여 지속적인 모니터링과 적절한 예방대책이 요구된다.

## 사 사

이 논문은 2013년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(2013R1A1A2061851).

## References

- A.P.H.A. 1970. Recommended procedures for the examination of seawater and shellfish. 4th Ed. American Public Health Association, Washington DC, U.S.A, 1-47.
- Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones DD and Kaysner CA. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Meth 36, 215-225.
- Blake PA, Weaver RE and Hollis DG. 1980. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Annu Rev Microbiol 34, 341-367.
- Cantet F, Hervio-Heath D, Caro A, Le Mennec C, Monteil C, Quemere C, Jolivet-Gougeon A, Colwell RR and Monfort P. 2013. Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. Res Microbiol 164, 867-874. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2013.06.005>.
- Chen M, Guo D, Wong HC, Zhang X, Liu F, Chen H, Chen M, Liu B, Wang L, Wu F and Feng L. 2012. Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. Int J Food Microbiol 159, 122-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.012>.
- Copin S, Robert-Pillot A, Malle P, Quilici ML and Gay M. 2012. Evaluation of most-probable-number-PCR method with internal amplification control for the counting of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in frozen shrimps. J Food Prot 75, 150-153. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-165>.
- DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B and McPhearson RM. 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. Appl Environ Microbiol 56, 2299-2302.
- Fang FC and Rimsky S. 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. Curr Opin Microbiol 11, 113-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.011>.
- Honda T and Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. Rev Med Microbiol 4, 106-113.
- Hossain MT, Kim EY, Kim YR, Kim DG and Kong IS. 2011. Application of *groEL* gene for the species-specific detec-

Table 3. Levels of *Vibrio parahaemolyticus* in short-necked clam *Ruditapes philippinarum* in Gomso Bay from July to August 2013

Month	St.	<i>V. parahaemolyticus</i> (MPN/100 g)
July	S-1	1,700
	S-2	1,100
	S-3	780
Aug.	S-1	2,100
	S-2	2,100
	S-3	1,700

St., Station.

- tion of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. Lett Appl Microbiol 54, 67-72. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03174.x>.
- Kaneko T and Colwell RR. 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. Appl Microbiol 29, 269-274.
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S and Nishibuchi M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J Clin Microbiol 37, 1173-1177.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. Lancet 361, 743-749.
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). 2014. Korea food code. Retrieved from <http://www.mfds.go.kr/e-stat/index.do?nMenuCode=20> on September 15.
- No AR, Okada K, Kogure K and Park KS. 2011. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR targeted to the histone-like nucleoid structure (H-NS) gene and its genetic characterization. Lett Appl Microbiol 53, 127-133. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03072.x>.
- Park KS, Arita M, Iida T and Honda T. 2005. *vpaH*, a gene encoding a novel Histone-like nucleoid structure-like protein that was possibly horizontally acquired, regulates the biogenesis of lateral flagella in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* TH3996. Infect Immun 73, 5754-5761.
- Sakazaki R, Tamura K, Kato T, Obara Y and Yamai S. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. Jpn J Med Sci Biol 21, 325-331.
- Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y and Nishibuchi M. 1990. Molecular epidemiological evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. Infect Immun 58, 3568-3573.
- Su YC, Duan J and Wu WH. 2005. Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot 68, 1454-1456.
- Venkateswaran K, Dohmoto N and Harayama S. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. Appl Environ Microbiol 64, 681-687.
- Wang R, Huang J, Zhang W, Lin G, Lian J, Jiang L, Lin H, Wang S and Wang S. 2011. Detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplex PCR and DNA-DNA hybridization on a microarray. J Genet Genomics 38, 129-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2011.02.002>.
- Wei S, Zhao H, Xian Y, Hussain MA and Wu X. 2014. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. Diagn Microbiol Infect Dis 79, 115-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.012>.
- Yu S, Chen W, Wang D, He X, Zhu X and Shi X. 2010. Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis. FEMS Microbiol Lett 307, 65-71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01952.x>.