

Ethidium monoazide (EMA) – PCR 법을 이용한 비배양성 생존 상태(VBNC)의 *Edwardsiella tarda* 검출

강남이 · 김은희[†]

전남대학교 수산생명의학과

Differentiations between the viable but nonculturable (VBNC) or dead state of *Edwardsiella tarda* by ethidium monoazide (EMA) treatment-PCR

Nam I Kang and Eunheui Kim[†]

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

Edwardsiella tarda predominantly causes edwardsiellosis in fish at high temperature, but is rarely isolated from water when water temperature is low. However, *E. tarda* is viable but nonculturable (VBNC) in low water temperature, but it can be revived when water temperature rises and cause disease to fish. Therefore, in order to prevent disease, it is very important to identify pathogens that are in the VBNC state in environmental water. In this study, *E. tarda* cells in the VBNC state were detected by the ethidium monoazide (EMA)-PCR method using the low-temperature oligotrophic sea water microcosm obtained by inoculation of *E. tarda* at a concentration of 10^8 CFU/ml. In order to distinguish between live and dead bacteria in *E. tarda*, each sample was treated with EMA at different concentrations, photoactivated with a 500 W halogen lamp, and PCR was performed with *E. tarda* specific primer. At the concentration of 10^7 CFU/ml bacterium, DNA amplification was observed only in the live cells when treated with 60 μ g/ml of EMA, and smaller amounts of live cells could be distinguished from dead cells by adjusting the EMA concentration. In addition, the VBNC cells of *E. tarda* in the oligotrophic low temperature seawater microcosm were estimated to be in the range of $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml by EMA-PCR. Therefore, it is possible to detect VBNC cells that will act as potential pathogens in environmental water using EMA-PCR method, and quantitative confirmation using concentration change is also possible.

Key words: Ethidium monoazide (EMA), PCR, VBNC, *E. tarda*, Dead cell

*Edwardsiella tarda*는 주로 고수온기에 어류에 에드워드병을 유발하지만 수온이 낮아지면 수중에서 거의 분리되지 않는다. 그러나 낮은 수온에서 *E. tarda*는 모두 사멸된 것이 아니라, viable but

nonculturable (VBNC) 상태로 존재하다가 수온이 상승하면 소생하여 어류에게 질병을 일으킬 수 있다. 그러므로 질병 예방 차원에서 환경수 내의 VBNC 상태인 병원균을 확인하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 10^8 CFU/ml의 농도로 *E. tarda*를 접종하여 VBNC 상태를 유도한 저온 빈영양 해수 microcosm을 시료로 이용하여, ethidium mono-

[†]Corresponding author: Eunheui Kim
Tel: +82-61-659-7171, Fax: +82-61-659-7179
E-mail: ehkim@jnu.ac.kr

azide (EMA)-PCR 방법으로 VBNC 상태의 *E. tarda* 세포를 검출하고자 하였다. *E. tarda*의 생균과 사균을 구별하기 위하여 각각의 시료에 EMA를 농도별로 처리하여 500 W의 halogen lamp로 photo activation 시킨 후 *E. tarda* 특이 primer로 PCR을 실시하였다. 10^7 CFU/ml 세균농도에서는 EMA 60 µg/ml로 처리하였을 때 생균에서만 DNA 증폭이 확인되었으며 EMA농도를 낮게 조정함으로써 시료 내에 더 적은 양의 생균도 사균과 구분 가능하였다. 빈영양 저온 해수 microcosm 내에 있는 *E. tarda*의 VBNC 세포를 검출하기 위하여 EMA를 농도별로 처리하여 PCR을 실시한 결과, VBNC cell 이 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml의 농도인 것으로 추정되었다. 그러므로 EMA-PCR 방법을 이용하면 환경수 내에 있는 잠재적인 병원체로 작용할 VBNC cell을 검출하는 것이 가능할 뿐 아니라 농도변화를 이용하여 양적인 확인도 가능한 것으로 판단된다.

*Edwardsiella tarda*에 의해 발병되는 어류의 에드워드병은 주로 고수온기에 중점적으로 발생하다가 수온이 낮아짐에 따라 수중에서 병원체가 거의 분리되지 않는다. 그러나 수온이 낮은 겨울철에는 양식 환경에서 *E. tarda*를 세균배양방법으로 분리할 수는 없지만 비배양성 생존 (viable but non-culturable; VBNC) 상태로 있을 가능성이 제기되었다 (Sakai *et al.*, 1995).

일부 세균이 극한 환경에서의 생존 전략으로써 포자를 형성하는 것과 같이 영양고갈, 온도 변화, 삼투압, 식품보존료, 중금속, 백색광 노출과 같은 환경적 스트레스에 대한 생존전략으로 다른 세균들은 VBNC 상태를 유지하고 있다고 볼 수 있다. VBNC 세포는 일반적인 세균 배양 배지에서는 집락을 형성하지 않지만 적절한 조건이 되면 다시 배양 가능한 상태로 소생 될 수 있다 (McDougald *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2007b). 또한 병원체는 환경에서 VBNC 상태로 있을 때도 병원성을 보유하고 있으며 (del Mar Lleó *et al.*, 2007) 소생되었을 때는 감염도 가능한 것으로 보고되어있다 (Sun *et al.*, 2008).

공중 위생학적으로 음식물과 식수에 대한 검사는 대부분 배양에 기초하기 때문에 VBNC 상태 미생물의 존재는 인간에게 큰 위협이 될 수 있는 것

으로 받아들여지고 있다 (Colwell *et al.*, 1996). 일부 어류 병원세균의 경우에도 VBNC로 부터 소생된 cell은 독력을 보유한다는 것이 증명되고 있으므로 (Habibur Rahman *et al.*, 2001; Kang and Kim, 2016) VBNC cell은 수산 환경에서 잠재적인 병원체로 작용하고 있다하겠다. 따라서 수산양식장의 해수와 저질에서 발견될 수 있는 어류병원세균의 VBNC cell은 질병의 지속적인 발생 원인일 뿐 아니라, 감염 기작이 알려져 있지 않은 다양한 어병 세균의 기원으로도 볼 수 있다. 따라서 VBNC 상태의 세균과 사균 상태의 세균을 구별하기 위한 다양한 방법들이 시도되고 있다. 영양기질과 DNA 합성저해제를 첨가한 후, 단시간 배양하여 세포분열이 억제된 상태에서 신장, 비대된 세포를 검출하는 direct viable count (DVC) 방법, 온전한 세포질막의 유무로 확인할 수 있는 BacLight® 법, 막전위, 세포 내 효소 활동을 측정하는 multi-parameter flow cytometry 법, 지속적인 유전자 발현을 확인하는 reverse transcriptase PCR 등을 이용하여 VBNC 세포가 사균 세포와 다름을 증명하고 있다 (Whang *et al.*, 2003; Oliver, 2010). 또한 ethidium monoazide (EMA)를 이용하여 사균과 생균을 구별하고자 하는 연구도 있는데 (Lee and Levin, 2006; Wang *et al.*, 2012), EMA가 죽은 세포의 손상된 세포막을 선택적으로 통과하여 DNA에 결합함으로써 DNA 복제를 방해하므로, PCR에서 DNA가 증폭되지 않는 원리를 이용하고 있는 비교적 간단한 방법이다.

이에 본 연구에서는 EMA-PCR 방법을 이용하여 *E. tarda*의 사균 상태와 VBNC 상태가 구분 가능한 조건을 찾고 인위적으로 제작한 저온 빈영양해수로 부터 *E. tarda*의 VBNC 세포를 검출하는 것이 가능한 지를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주

본 연구에 사용된 *E. tarda* 103 균주는 2002년 7월 전라남도 해남에서 채집한 넙치 병어의 복수로부터 분리한 것이다. 냉동보관 되어있던 균을 tryptic soy agar (TSA, BD) 배지에서 25°C로 배양한 후 생화학적 특성을 분석하였고, 16S rRNA gene

sequence를 분석하여 database 내의 *E. tarda*와 염기 서열 identity가 100% 일치함을 확인 후 사용하였다.

*E. tarda*의 VBNC 상태 유도

TSA에서 31°C로 24시간 동안 배양된 *E. tarda*를 0.9% NaCl 용액으로 3회 세척하여 10⁸ CFU/ml가 되도록 멸균된 해수에 재부유하여 빈영양 해수 microcosm을 제작하였다 (Kang and Kim, 2016). Microcosm 제작을 위해 오래된 해수를 직경 0.45 µm membrane filter (Whatman, Germany)로 여과한 것을 이용하였으며 Du *et al.* (2007a)의 방법을 응용하여 microcosm 내의 *E. tarda*가 VBNC 상태로 유도 될 때까지 10 ± 1.0°C 배양기에 40일 이상 두었다. Microcosm 시료 10 ml를 직경 0.22 µm mixed cellulose ester filter (Advantec MFS, USA)로 여과한 후 필터를 TSA 배지에 올려 25°C에서 48시간 배양하였을 때 집락이 1 CFU 미만 (0.1 CFU/ml) 일 때 microcosm 전체가 VBNC 상태에 들어갔다고 판단하였다 (Baffone *et al.*, 2003).

*E. tarda*의 생균과 사균 제작

*E. tarda*를 tryptic soy broth (TSB, BD)로 25°C에서 24시간 동안 배양하여 약 10⁸ CFU/ml의 농도로 조정된 것을 생균시료로 사용 하였다. 생균 시료를 100°C water bath에서 15분 동안 인위적으로 열처리 한 후 TSA에 도말하여 25°C에서 24시간 동안 배양하여 집락이 형성되지 않은 것을 사균 시료로 이용하였다.

EMA를 농도 별로 처리

Abolmaaty *et al.* (2000)의 방법을 참고하여 농도 0.1 µg/µl의 EMA (Biotium) stock solution을 제조하여 -20°C에 보관하면서 필요에 따라 사용하였다. Lee and Levin (2006)의 방법을 응용하여 약 10⁷ CFU/ml의 *E. tarda* 생균 또는 사균을 구별하기 위한 EMA 농도 기준을 설정하고자 하였다. 시료를 EMA 40, 50, 60, 70, 80 µg/ml의 농도로 처리 한 즉시 25°C 암실로 옮겨 5분 동안 반응 하였다. 반응 시킨 시료의 tube 뚜껑을 열고 얼음에 놓은 후 500 W halogen lamp로 15 cm 거리에서 15분 동안 photo

activation 시켰다. Photo activation 시킨 시료를 13,000 RPM으로 4°C에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하고 멸균 증류수 20 µl에 재부유 하였다. Water bath에서 100°C로 10분 동안 열처리 한 후 원심 분리하여 상층액 1 µl를 PCR 실험의 template로 이용하였다.

균 농도별 EMA 처리

EMA 농도 40, 60 µg/ml에서 생균과 사균이 구별 될 수 있는 *E. tarda* 농도를 설정하기 위하여 0.9% NaCl 용액으로 *E. tarda*의 균 농도를 약 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ CFU/ml로 준비 한 후, EMA를 농도별로 처리하여 photo activation 시킨 후 원심분리하여 PCR template을 준비하였다.

*E. tarda*의 VBNC 균과 사균의 구별을 위한 EMA 농도 설정

VBNC cell과 사균을 구별하기 위해 EMA - PCR 을 실시하였다 (Wang *et al.*, 2012). *E. tarda*의 microcosm을 100°C에서 10분간 열처리한 것과 열처리 하지 않은 것을 준비하고 각각 EMA 0, 20, 40, 60, 80 µg/ml의 농도에서 photo activation 시킨 후 위와 동일한 방법으로 PCR template를 제작하였다.

특이 primer를 이용한 PCR

EMA 처리한 *E. tarda*의 DNA template 1 µl를 PCR premix (Bioneer, Korea)와 반응시켜 *E. tarda* 특이 primer (Table 1)를 이용하여 PCR을 실시하였다 (Sakai *et al.*, 2009). PCR 산물은 2% agarose gel 에 전기영동하여 278 bp의 밴드를 형성하는 양성 대조군의 결과와 비교하였다.

결과 및 고찰

병원세균은 다양한 환경적 스트레스로 인해 VBNC 상태에 진입 할 수 있다고 보고되고 있으며 (Oliver, 2010; Nowakowska and Oliver, 2013), VBNC 상태의 세균은 낮은 대사 활성을 가지고 있음에도 불구하고 소생이 되었을 때 배양 가능하며 독성을 나타 낼 수 있기 때문에 환경에서 VBNC 상태의 존재는 잠재적인 병원체로 중요하게 여겨

Table 1. Specific primer sets and conditions for the detection of *Edwardsiella tarda* by polymerase chain reaction

Primer code	Sequence (5' → 3')	Condition		
		Temp.	Time	Cycle
EDt-F	TTCCGCAACCATGATCAAAG	95	5 min	1
		95	30 sec	30
		55	30 sec	
EDt-R	AGGCATATATCCACTCACTG	72	30 sec	30
		72	5 min	
		72	5 min	1

F, forward; R, reverse

진다. Sakai *et al.* (1995)는 *E. tarda*를 10^6 CFU/ml 농도로 25°C에서 해수 또는 담수에서 배양하였을 때 해수에서는 7일, 담수에서는 15일 내에 plate 상 배양 가능한 cell이 계수되지 않는다고 하였다. 이 기간 후에 세균은 해수에서 사멸할 것인지 아니면 VBNC와 같은 상태로 남아있는지 알아보기 위하여 형광현미경을 이용한 DVC 방법을 이용하지만 VBNC cell을 계수 할 때 발생하는 시각적인 한계가 있어 이를 극복하고자 EMA - PCR 방법을 실시하였다.

생균과 사균 구분이 가능한 EMA 농도

*E. tarda*의 세균수가 약 10^7 CFU/ml 일 때 EMA - PCR로 *E. tarda* 생균 또는 사균을 구별 할 수 있는 EMA 농도를 알아보기 위하여 EMA 농도에 따른 *E. tarda*의 DNA 증폭여부를 비교하였다 (Fig. 1). 생균은 모든 EMA 농도에서 DNA band가 검출된 반면 세포막이 손상된 사균은 70 µg/ml 이상의 농도에서는 DNA band가 검출되지 않았으며 60 µg/ml의 농도에서는 DNA band가 약하게 나타났으며

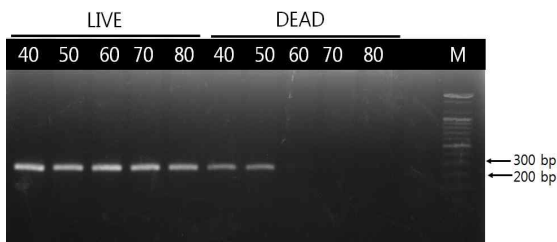


Fig. 1. DNA amplification in live or heat-killed *Edwardsiella tarda* (10^7 CFU/ml) photoactivated at various concentrations of EMA 40, 50, 60, 70, or 80 µg/ml. M, 100 kb ladder used as a size marker.

로 *E. tarda* 10^7 CFU/ml에서 생균과 사균을 구분할 수 있는 EMA 최소 농도를 60 µg/ml로 결정하였다. EMA 40 ~ 50 µg/ml로 처리한 사균 시료에서 DNA 증폭이 일어난 것은 EMA 농도에 비하여 균의 농도가 높았기 때문인 것으로 판단된다.

EMA에 의한 *E. tarda* 생균 검출 한계

EMA 40 µg/ml과 60 µg/ml에서 생균과 사균이 구별 될 수 있는 *E. tarda* 농도를 확인하였다 (Fig. 2 and 3, Table 2). 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml의 생균 또는 사균 *E. tarda*를 EMA 60 µg/ml 농도로 처리하였을 때 10^5 CFU/ml의 농도에서는 모두 DNA 증폭이 억제된 반면 약 10^6 CFU/ml에서는 사균 *E. tarda*는 DNA 증폭이 완전히 억제되었으나 생균 *E. tarda*는 DNA가 증폭됨으로써 생균과 사균의 구별이 가능하였다. 하지만 10^7 ~ 10^8 CFU/ml 농도에서는 생균과 사균 모두에서 DNA 증폭이 일어나 구분이 불가능하였다.



Fig. 2. DNA amplification of live and heat-killed *Edwardsiella tarda* at various concentrations ; 10^5 , 10^6 , 10^7 or 10^8 CFU/ml, photoactivated with 60 µg/ml of EMA. P, original *E. tarda*; M, 100 kb ladder used as a size marker.

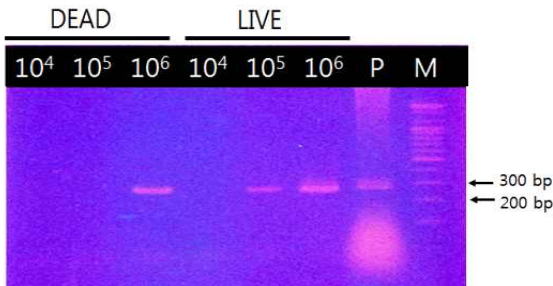


Fig. 3. DNA amplification of live and heat-killed *Edwardsiella tarda* at various concentrations (10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/ml) photoactivated with 40 µg/ml of EMA. P, original *E. tarda*; M, 100 kb ladder used as a size marker.

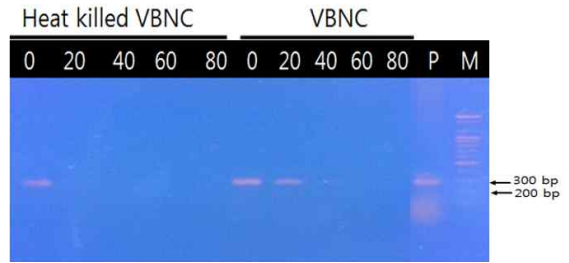


Fig. 4. DNA amplification of the heat-treated VBNC and VBNC of *Edwardsiella tarda* photoactivated with various concentrations of EMA; 0, 20, 40, 60, 80 µg/ml. P, original *E. tarda*; M, 100 kb ladder used as a size marker.

Table 2. Comparisons of DNA amplification according to the concentration of *Edwardsiella tarda* (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 CFU/ml) with 40 µg/ml or 60 µg/ml of EMA

EMA(µg/ml)	60		40	
	Live	Dead	Live	Dead
CFU/ml				
10^8	+	+		
10^7	+	+(pale)	No data	
10^6	+	-	+	+
10^5	-	-	+	-
10^4	No data		-	-

+, DNA amplification; -, no DNA amplification.

한편 *E. tarda*을 EMA 40 µg/ml의 농도로 처리하였을 때는 EMA 60 µg/ml으로 처리하였을 때 생균과 사균이 구분 된 농도 보다 더 낮은 10^5 CFU/ml에서 생균과 사균의 구별이 가능하였다. EMA 농도가 낮아짐에 따라 생균과 사균을 구별할 수 있는 균의 농도는 낮아졌는데 이는 EMA 처리 농도를 달리함으로써 시료 내에 살아있는 세균수를 추측

할 수 있음을 시사하였다. 또한 *E. tarda*의 균 농도에 비하여 EMA 농도가 높으면 살아있는 세포막이라도 EMA가 침투하여 DNA 증폭이 억제됨을 알 수 있었다.

VBNC *E. tarda*의 검출

모든 *E. tarda*가 VBNC 상태에 진입한 빈영양해수 microcosm을 열처리 한 것과 열처리 하지 않은 시료에 EMA를 40 µg/ml로 처리한 후 EMA-PCR을 실시한 결과 모든 시료에서 VBNC cell과 사균이 구분 가능하였다 (Fig. 4 and Table 3). 20 µg/ml로 처리 하였을 때는 5개 시료 중 2개의 시료에서 생균과 사균의 구분이 가능했지만 60 이나 80 µg/ml의 EMA 농도에서는 모두 DNA 증폭이 억제되어 VBNC인 생균과 사균의 구분이 불가능했다. EMA 40, 60 µg/ml에서 *E. tarda*의 생균과 사균을 농도별로 처리한 결과 (Table 2)와 EMA 20 ~ 40 µg/ml에서 VBNC *E. tarda*의 DNA 증폭이 확인

Table 3. Comparisons of DNA amplification according to the concentrations of EMA in the heat-treated VBNC and VBNC cells of *Edwardsiella tarda* artificially induced in low temperature oligotrophic sea water microcosm

Sample	EMA (µg/ml)					Dead cell					VBNC cell				
	0	20	40	60	80	0	20	40	60	80	0	20	40	60	80
A	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-					
B	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-					
C	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-					
D	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-					
E	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-					

+, PCR amplification; -, NO PCR amplification

된 결과 (Table 3)를 비교하여 볼 때 VBNC *E. tarda*는 약 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml의 농도로 빈영양 해수 microcosm 내에 있을 것이라 추측되었으며 이는 DVC 방법으로 VBNC cell을 계수한 결과 (Kang and Kim, 2016)와 일치하였다 .

Elabed *et al.* (2012)은 *Pseudomonas aeruginosa*가 VBNC 상태로 해수 microcosm에 14년 동안 유지하였음에도 불구하고 nutrient broth를 첨가하였을 때 소생되었으며, 소생 후 48시간이 경과하여 original cell의 특성을 회복하였음을 보고하였다. 많은 병원성 세균들이 VBNC 상태에서 독력을 유지한다는 보고가 있다. Colwell *et al.* (1996)은 VBNC 상태로 23일 동안 보관되었던 *Vibrio cholerae*를 섭취한 사람의 대변으로부터 배양 가능한 세포를 분리하였다. Zhong *et al.* (2009)은 소생된 *Vibrio cincinnatiensis*를 zebra fish에게 복강 접종하였을 때 병원성을 나타내었다고 보고 하였다. 이와 같은 결과에 근거해 볼 때 온도가 상승하는 봄과 여름철에 세균성 병원체에 의해 발생하는 어류폐사는 original cell의 감염에 의한 것일 수도 있지만 VBNC cell이 환경수 중에서 소생되어 강한 병원체로 작용해 폐사를 야기한 것일지도 모른다고 생각된다. 또한 del Mar Lleò *et al.* (2003)이 보고한 바에 따르면 *Enterococcus faecalis*의 VBNC cell은 growing cell에 비하여 vancomycin에 대하여 500배 이상의 증가된 내성을 보였다. 따라서 질병이 발생한 어류에 항균제 처리를 하더라도 VBNC 상태의 병원균은 살아남아 다시 재감염을 일으키는 것으로 여겨진다. 그러므로 농도변화를 이용하여 양적인 확인도 가능한 EMA-PCR 방법은 환경수 내에 있으면서 잠재적인 병원체로 작용할 VBNC cell을 모니터링하기에 적합한 방법으로 판단된다.

References

- Abolmaaty, A., Vu, C., Oliver, J. and Levin, R.: Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios.*, 101: 181-189, 2000.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L. and Donelli, G.: Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *J. Food Microbiol.*, 89: 31-39, 2003.
- Colwell, R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A. and Levine, M.: Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 28-31, 1996.
- del Mar Lleò, M., Benedetti, D., Tafi, M.C., Signoretto, C. and Canepari, P.: Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ. Microbiol.*, 9: 2313-2320, 2007.
- del Mar Lleò, M., Bonato, B., Signoretto C., and Canepari, P.: Vancomycin resistance is maintained in enterococci in the viable but nonculturable state and after division is resumed. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47: 1154-1156, 2003.
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y. and Wang, Y.: Retention of virulence in a viable but non-culturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 1349-1354, 2007a.
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A. and Li, Y.: Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Arch. Microbiol.*, 188: 283-288, 2007b.
- Elabed, H., Bakhrouf, A., Hamza, R., Azaiez, M. and Gaddour, K.: Evidence of the adaptive response in *Pseudomonas aeruginosa* to 14 years of incubation in seawater. *Ann. Microbiol.*, 62: 1385-1394, 2012.
- Habibur Rahman, M., Suzuki, S. and Kawai, K.: Formation of viable but non-culturable state (VBNC) of *Aeromonas hydrophila* and its virulence in goldfish, *Carassius auratus*. *Microbiol. Res.*, 156: 103-106, 2001.
- Kang, N.I. and Kim, E.: Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Edwardsiella tarda*. *Kor. J. Microbiol.*, 52: 313-318, 2016.
- Lee, J.L. and Levin, R.E.: Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods.*, 67: 456-462, 2006.
- McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D. and Kjelleberg, S.: Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol.*, 25: 1-9, 1998.
- Nowakowska, J. and Oliver, J.D.: Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 84: 213-222, 2013.
- Oliver, J.D.: Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol.*

- Rev., 34: 415-425, 2010.
- Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M.: Survival of fish pathogen *Edwardsiella tarda* in sea water and fresh water. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 14: 188-190, 1995.
- Sakai, T., Yuasa, K., Sano, M. and Iida, T.: Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene. J. Aquat. Anim. Health., 21: 124-132, 2009.
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X.h., Wang, R., Guo, Q. and Dong, Y.: Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. FEMS Microbiol. Ecol., 64: 37-44, 2008.
- Wang, L., Zhong, Q. and Li, Y.: Ethidium monoazide-loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. Energy Procedia., 17: 1858-1863, 2012.
- Whang, K.S., Yang, H.C. and Takashi, S.: The detection and a quantitative evaluation of viable but non-culturable soil bacteria using a modified direct viable count method. Kor. J. Microbiol., 29: 209-214, 2003.
- Zhong, L., Chen, J., Zhang, X. and Jiang, Y.: Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. Lett. Appl. Microbiol., 48: 247-252, 2009.

Manuscript Received : Oct 20, 2018

Revised : Oct 30, 2018

Accepted : Oct 30, 2018