pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 3, pp. 123~130 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.3.123

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

전배양과 탈염과정을 포함하는 DNA 추출법을 이용한 분자생물학적 방법으로 수산물 중 오염된 *Salmonella* spp.의 검출

송예준[1] · 조경진[2] · 손은익[3] · 조두민[2] · 김영목[4]* · 박슬기[5]*

[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 미생물과, [2]부경대학교 식품공학과
[3]식품의약품안전처 식품의약품안전처본부 식품기준기획관 식품기준과
[4]부경대학교 식품과학부, [5]한국식품연구원 스마트제조사업단

Detection of *Salmonella* spp. in Seafood via Desalinized DNA Extraction Method and Pre-culture

Ye-Jun Song[1], Kyung-Jin Cho[2], Eun-Ik Son[3], Du-Min Jo[2], Young-Mog Kim[4]*, Seul-Ki Park[5]*

[1]*Food Microbiology Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea*
[2]*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan, Korea*
[3]*Food Standard Division, Food Standard Planning Office, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea*
[4]*Division of Food Science, Pukyoung National Universitry, Busan, Korea*
[5]*Smart Food Manufacturing Project Group, Korea Food Research Institute, Wanju, Korea*

(Received April 10, 2023/Revised April 29, 2023/Accepted May 2, 2023)

ABSTRACT - *Salmonella* spp. are prevalent foodborne pathogens that are infective at relatively low concentrations, thus posing a serious health threat, especially to young children and the elderly. In several countries, the management and regulation of *Salmonella* spp. in food, including seafood, adhere to a negative detection standard. The risk of infection is particularly high when seafood is consumed raw, which underscores the importance of timely detection of pathogenic microorganisms, such as *Salmonella.* Accordingly, this study aimed to develop a combined pre-treatment and detection method that includes pre-culture and DNA extraction in order to detect five species of *Salmonella* at concentrations below 10 CFU/mL in seafood. The effectiveness of the proposed method was assessed in terms of the composition of the enrichment (pre-culture) medium, minimum incubation time, and minimum cell concentration for pathogen detection. Furthermore, a practical DNA extraction method capable of effectively handling high salt conditions was tested and found to be successful. Through polymerase chain reaction, *Salmonella* spp. were detected and positively identified in shellfish samples at cell concentrations below 10 CFU/g. Thus, the proposed method, combining sample pre-treatment and cell culture with DNA extraction, was shown to be an effective strategy for detecting low cellular concentrations of harmful bacteria. The proposed methodology is suitable as an economical and practical *in situ* pre-treatment for effective detection of *Salmonella* spp. in seafood.

Key words: *Salmonella* spp., Enrichment, Desalting, DNA extraction, PCR

*Correspondence to: Seul-Ki Park, Smart Food Manufacturing Project Group, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea
Tel: +82-63-219-9275, Fax: +82-62-219-9876
E-mail: skpark@kfri.re.kr
*Co-correspondence to: Young-Mog Kim, Division of Food Science, Pukyoung National University, Busan 48513, Korea
Tel: +82-51-629-5832, Fax: +82-51-629-5824
E-mail: ymkim@pknu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

Salmonella spp.는 그람 음성이며 포자를 형성하지 않는 통성혐기성 간균으로 O-항원과 H-항원에 따라 구분되며 현재까지 약 2,600여종 이상의 혈청형이 알려져 있다[1-2]. *Salmonella* spp.는 대표적인 식중독 병원균 중 하나로 모든 혈청형이 인간에게 질병을 유발할 수 있으며, 일반적으로 설사, 발열, 위경련, 구토 및 두통과 같은 증상을 일으키며 장티푸스, 패혈증 등을 유발할 수 있고 심하면 사망에 이를 수 있다[3,4]. 살모넬라증(Salmonellosis)은 수산물, 유제품, 계란, 야채와 같은 *Salmonella* spp.에 오염된 식품의 섭취에 의해 감염되며 낮은 농도의 살모넬라균에 의해서도 발병할 수 있다[5]. 또한, 최근에는 다양한 수산물 원료에서도 *Salmonella* spp.이 검출되고 있으며[6,7], 미국, 유럽, 중국 및 한국 등 대다수 선진국에서 수산물 중 살모넬라균의 검출 기준을 불검출로 규정하여 관리하고 있다[8]. 특히, 패류는 여과섭이에 의해 소화기관에 미생물 및 바이러스 등이 축적되는 특성을 가져 빠르게 부패되는 특성이 있으며[9], 날 것으로 섭취하는 경우가 많아 병원성 미생물 등에 의한 질환의 발생 가능성이 높다[10].

수산물을 비롯한 다양한 식품에서 *Salmonella* spp.를 검출하기 위한 방법으로 분리 배양법, 분자생물학적 방법 및 면역학적 분석법 등을 사용하고 있다. 분리 배양을 기반으로 한 검출 방법은 *Salmonella* spp.를 검출하기까지 최소 3-5일 이상의 시간이 소요되기 때문에 수산물과 같은 신선 식품의 조기 진단에는 적합하지 않다[11]. 면역학적 분석법은 체세포 또는 편모 항원과 결합하는 단일 또는 클론 항체를 사용하는 방법으로 다양한 식품에서 *Salmonella* spp.의 검출에 이용되고 있다[12]. 면역학적 방법은 신속 검출에는 유리하지만 시료의 matrix에 의한 민감도 저해, 높은 비용 및 낮은 검출 한계 등의 단점이 있다[13]. 분자생물학적 방법은 검출 시간이 비교적 짧고 민감도 및 정확도가 높은 장점을 가지고 있지만, 유전자 증폭을 위해 DNA를 추출하는 과정이 복잡하며 숙련된 전문가가 수행해야 민감도가 높으며 고가의 장비가 필수적이기 때문에 수산물 생산현장 등에서 적용하기 어려운 단점이 있다[14,15]. Polymerase chain reaction (PCR)과 같은 분자생물학 진단 방법의 미생물학적인 검출 한계는 10^2-10^4 CFU/mL로 식품 중 낮은 농도로 존재하는 *Salmonella* spp.를 검출하기 위해 증균 배양 및 농축 등의 전처리 과정이 필요하다[16,17]. 병원성 미생물은 다양한 농도로 식품 중에 오염되어 있으며 매우 낮은 농도로도 인체에 위해를 가할 수 있는 살모넬라균과 같은 식중독균이 있어 검출 민감도를 높일 수 있는 증균 과정은 매우 중요하다고 알려져 있다[18,19]. 이에 분자진단법 기반 신속 검출법을 위한 전처리 방법에 대해 연구가 진행되고 있으며, immunomagnetic separation (IMS), 원심분리, 여과법 및 증균 배양 등의 방법이 있으며[20-22], 전처리 과정 이후 PCR 등의 분자진단법을 이용하여 병원성 미생물을 검출하고 있다. Choi 등[23]은 돼지고기 및 쇠고기 시료에 1, 2 및 3 log CFU/g 농도의 *Escherichia coli* O157:H7을 인위적으로 오염시켜 원심분리와 여과과정을 수행하여 고기 시료의 종류에 상관없이 2-3 log CFU/g 수준의 *E. coli* O157:H7을 검출하였다. Wei 등[24]은 콩나물에서 *Listeria monocytogenes*를 검출하기 위해 IMS와 quantitative PCR (qPCR) 이용 시 검출한계를 4.4 log CFU/g로 보고하였다. 원심분리 및 여과를 이용한 미생물 분리는 검출할 수 있는 미생물의 검출한계가 낮고, IMS의 경우 가격이 비싸고 식품에서 병원성 미생물이 분리되지 않을 확률이 높은 단점이 있다[25,26]. 증균 배양을 이용한 방법은 식품 중 낮은 농도로 오염된 병원성 미생물의 농도를 분자진단법의 검출한계까지 증가시켜 병원성 미생물을 검출하기 위해 사용되고 있다[27]. 증균 배양 시간에 따라 목표로 하는 병원성 미생물의 생육이 저해되고 우점종이 바뀌는 등의 문제가 발생할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 수산물 시료에 오염된 낮은 농도의 *Salmonella* spp.를 분자생물학적 방법을 이용하여 검출하기 위해 짧은 시간의 전배양과 신속하고 단순한 방법의 DNA 추출방법을 포함한 전처리 방법에 대해 연구하였다.

Materials and Methods

사용 균주

본 연구에 사용된 균주는 *Salmonella* spp. 5종으로, *Salmonella* Typhimurium KCTC 1925 및 *Salmonella* Enterica KCTC 2514는 생물자원센터(KCTC, Korean Collection for Type Cultures, Jeongeup, Korea), *Salmonella* Enteritidis KCCM 1202는 한국 미생물 보존센터(KCCM, Korea Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea), *Salmonella* Derby KBN12P06515 및 *Salmonella* Bovismorbificans KBN12P06471는 경상대학교 병원에서 분리된 균주를 분양 받아 사용하였다. 모든 균주는 nutrient broth (NB, Difco, Detroit, MI, USA)에 0.5% $NaCl_2$ (w/v)을 첨가한 배지(이하 NB 0.5)를 이용하여 37°C에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

수산물(패류) 시료

수산물(패류) 시료는 짧은 전배양과 DNA 추출과정을 검증하기 위하여 구매하였으며, 포항 죽도시장, 부산 자갈치시장 및 통영 중앙시장에서 가리비, 굴, 대합, 바지락, 백합, 웅피 및 홍합을 지역별로 구매하였다. 구매 당일 10°C 이하를 유지하면서 실험실로 운반하여 패각을 제거하고 전배양 및 *Salmonella* spp. 검출을 위하여 패육 30 g에 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 270 g을 가하여 2분간 stomacher (BagMixer 400 VW, Interscience, Saint Nom la Bretêche, France)로 균질화하였다.

배양 시간에 따른 *Salmonella* spp. 증균 효율

Salmonella spp.의 신속검출을 위한 전배양 조건을 탐색

하기 위해 배양 시간에 따라 증균 효율을 검토하였다. 증균 과정은 전체 2시간 동안 수행하였으며, 증균 전, 1 h 및 2 h 후의 생균수를 측정하여 증균 효율을 비교하였다. 실험은 5종의 *Salmonella* spp.를 NB 0.5에 최종 농도 10^0, 10^1 및 10^2 CFU/mL로 접종하여 실험에 사용하였다. 대부분 수산물에서 *Salmonella* spp.는 낮은 농도로 존재한다고 알려져 있어[28,29], 오염 농도를 낮게 설정하였다. 생균수 실험은 10^0 및 10^1 CFU/mL의 낮은 농도의 경우 일반적인 표준평판법에서는 집락수 계수가 어렵기 때문에 식품공전[30] 중 표준평판법을 변형하여 사용하였으며, 각 균주를 농도에 맞게 희석한 희석수를 2배 농도의 NB 0.5 동량과 혼합 및 응고시켜, 35°C에서 48시간 배양한 후 집락수를 계수하여 확인하였다.

Salmonella spp.를 인위적으로 감염시킨 홍합 시료

자연적으로 *Salmonella* spp.에 오염된 패류 시료를 이용한 증균 효과와 탈염 과정을 포함하는 DNA 추출법 등을 연구하기 위해 *Salmonella* spp.를 홍합시료에 낮은 농도로 인위적으로 감염시켜 연구에 사용하였다. 홍합은 병원성 미생물의 오염도가 높다고 알려져 있으며[31], 부산에 소재한 수산물 시장에서 구매하여 당일 내 실험실에 운반하여 패각을 제거한 뒤 실험에 사용하였다. *Salmonella* spp.를 농도별로 인위적으로 감염시킨 홍합시료는 전배양과정에서 endogenous microbiota의 영향을 평가하기 위하여 멸균(Autoclave, Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan)을 수행한 것과 하지 않은 것으로 구분하고, 홍합 시료 81 g에 *Salmonella* spp. 5종을 각각 십진 희석하여 최종적으로 10^0, 10^1 및 10^2 CFU/g 수준으로 오염시켰다.

수산물(패류) 시료에서 신속한 DNA extraction

분자생물학적 진단법을 사용하여 수산물 중 *Salmonella* spp.를 검출하기 위해 현장에서 적용 가능한 DNA 추출법을 연구하였다. 단순한 과정을 통하여 시료로부터 DNA를 추출하기 위해서 Mahmoud 등[32]의 방법과 Ahmed 등[33]의 방법을 변형하여 사용하였다. 재료 및 방법 중 '배양 시간에 따른 Salmonella spp. 증균 효율'에서 언급된 방법에 따라 전배양을 수행하고 홍합 시료 1 g를 microcentrifuge Tube에 옮긴 후 원심분리(6,032 × *g*, 5 min)하여 상등액을 버린 후 lysis buffer (TL buffer, Bioneer Co., Ltd, Daejeon, Korea) 180 μL를 가하여 100°C에서 10분 boiling을 통해 균을 용해시킨 후 원심분리(6,032 × *g*, 5 min)한 후 DNA 순도 상승과 불순물 제거를 위하여 binding column (Bioneer Co., Ltd, Daejeon, Korea)에 용해액을 넣고 원심분리(6,032 × *g*, 1 min) 후 하단의 용액을 버렸다. 세척은 ethanol (Duksan, Seoul, Korea) 0.5 mL를 첨가하고 원심분리(6,032 × g, 3 min) 후 하단의 용액을 버렸다. 멸균 3차 증류수 50 μL를 중심부에 가한 뒤 실온에서 10분간 방치 후 원심분리 (6,032 × *g*, 5 min)하여 DNA를 추출하였다. 또한, 수산물 시료에서 추출된 DNA에 함유된 염은 PCR 시 유전자 증폭 효소의 활성을 낮추며, DNA의 화학적 성질을 변화시켜 PCR 검출에서 inhibitor로 작용할 수 있기 때문에[34], 추출된 DNA의 염 농도를 염도계(CAS salt free 2500; CAS-corporation, Seoul, Korea)로 측정하였다.

Salmonella spp. 검출을 위한 PCR 조건

PCR에 사용한 *Salmonella* spp.의 특이적 primer는 Yanestria 등[35]이 사용한 *inv*A 139 (5'-GTGAAATTATCGC CACGTTCGGGCAA-3') 및 *inv*A 141 (5'-TCATCGCACC GTCAAAGGAAC-C-3')를 Bioneer (Daejeon, Korea)사에서 합성 및 정제하여 사용하였다. 반응 조건은 94°C에서 5 분간 열변성 후, 94°C에서 30 초, 64°C에서 30 초, 72°C에서 30 초로 25회 반복한 후 72°C에서 4 분간 더 반응시켰다. Liu 등[36]에 따르면 *Salmonella* spp.를 검출 시 낮은 DNA 농도는 PCR의 결과에 영향을 미칠 수 있다고 보고한 바 있으며, 본 연구에서 사용된 *Salmonella* spp.의 농도가 낮기 때문에, PCR 검출의 정확도를 높이기 위하여 기 수행된 PCR 증폭산물을 이용하여 동일한 조건의 PCR을 한번 더 수행하였다.

통계 분석

각 시료에 대한 분석은 3회 반복 수행하였고, 모든 측정치는 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 나타내었으며, 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Sciences; v.23.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) software package를 사용하여 분산 분석(ANOVA)을 수행한 후, 다중범위검정(Duncan`s multiple range test)으로 결과의 유의성(P<0.05)을 검증하였다.

Results and Discussion

배양 시간에 따른 *Salmonella* spp.의 증균 효율

각 농도별 *Salmonella* spp.의 시간에 따른 증균 결과는 Table 1에 나타나 있으며, 5종의 *Salmonella* spp.는 2 시간 동안 모든 농도에서 약 1 log CFU/mL가 증균 되어 초기 농도와 유의적인 차이가 나타났다 (P<0.05). Dhakal 등[37]과 Ledeboer 등[38]의 연구에서 배양온도와 배지 조성을 달리하여 시간 경과에 따라 *Salmonella* spp.의 증균 속도에 차이가 있었지만, 모든 조건에서 1 시간이 경과한 이후부터 급격하게 증균 되었으며, 이는 *Salmonella* spp.의 생육곡선 중 유도기와 대수증식기의 차이에 기인한 것으로 보고된 바 있다. 또한 Ma 등[39]에 따르면 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. 및 *Shigella* spp.가 약 1 log CFU/g 이상일 경우 qPCR로 검출이 가능하였으며, Kim 등[40]은

Table 1. Viable cell count cultured in the medium for 2 h of 5 types of *Salmonella* spp. according to the initial cell concentration

Species	Initial concentration (log CFU/mL)	Viable cells count (log CFU/mL)			
		Before	1 h	2 h	Increase value
S. Typhimurium	0.00-0.99	0.25±0.25 [b1,2)]	0.33±0.22 [b]	1.17±0.08 [a]	0.99±0.04
	1.00-1.99	1.11±0.08 [c]	1.23±0.08 [b]	2.06±0.14 [a]	0.95±0.04
	2.00-2.99	2.07±0.14 [b]	2.09±0.05 [b]	3.03±0.16 [a]	0.96±0.02
S. Enteritidis	0.00-0.99	0.54±0.14 [b]	0.82±0.23 [b]	1.73±0.21 [a]	1.18±0.18
	1.00-1.99	1.46±0.09 [b]	1.67±0.19 [b]	2.64±0.13 [a]	1.18±0.06
	2.00-2.99	2.40±0.07 [c]	2.62±0.16 [b]	3.59±0.11 [a]	1.18±0.07
S. Enterica	0.00-0.99	0.36±0.25 [b]	0.59±0.42 [b]	1.28±0.21 [a]	0.91±0.02
	1.00-1.99	1.36±0.14 [b]	1.48±0.15 [b]	2.28±0.15 [a]	0.90±0.04
	2.00-2.99	2.31±0.12 [b]	2.45±0.07 [b]	3.22±0.10 [a]	0.91±0.02
S. Derby	0.00-0.99	0.70±0.14 [b]	0.88±0.26 [b]	1.81±0.10 [a]	1.10±0.06
	1.00-1.99	1.67±0.11 [b]	1.84±0.14 [b]	2.75±0.09 [a]	1.08±0.08
	2.00-2.99	2.63±0.09 [b]	2.78±0.09 [b]	3.76±0.05 [a]	1.12±0.08
S. Bovismorbificans	0.00-0.99	0.83±0.10 [c]	1.00±0.09 [b]	1.86±0.01 [a]	1.03±0.03
	1.00-1.99	1.77±0.08 [c]	1.93±0.07 [b]	2.81±0.04 [a]	1.03±0.03
	2.00-2.99	2.72±0.04 [c]	2.85±0.15 [b]	3.78±0.05 [a]	1.06±0.08

[1)] Values are means±SD.
[2)] Values sharing the same lowercase letter within a row are not significantly different at $P<0.05$

S. Thompson이 10 CFU/mL 이상일 경우 droplet digital PCR로 검출이 가능하다고 보고하였다. 또한 Shamloo 등[41)]에 따르면, 증균 시간이 너무 길어질 경우 검출목표로 하는 미생물이 우점하지 못하는 경우가 발생하여 오히려 검출률이 낮아질 수도 있다고 보고한 바 있다. 따라서, 이 결과에 따르면 낮은 농도의 *Salmonella* spp.가 수산물 시료 중 오염되어 있더라도 2시간의 짧은 증균을 통해서도 분자생물학적 검출이 가능한 수준의 세포수를 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

탈염 과정이 포함된 DNA extraction 방법

재료 및 방법 패류시료에서 신속한 DNA extraction에서 서술한 바와 같이 Mahmoud 등[32)]의 방법과 Ahmed 등[33)]의 DNA 추출법을 변형하여 인위적으로 감염시킨 지역별 패류시료에서 DNA를 추출한 뒤 염 농도를 측정한 결과와 추출된 DNA로 PCR한 결과를 Table 2에 나타내었다. 지역별 채취된 패류시료의 염농도는 3.96%-6.23%로 다양하게 나타났으며, *S.* Typhumurium을 인공오염시킨 뒤 DNA를 추출하여 DNA의 염 농도를 측정한 결과 모든 시료에서 0%로 나타났다. 또한, 추출된 DNA를 이용한 PCR을 수행한 결과, 모든 시료에서 *S.* Typhimurium에 특이적 양성밴드가 확인되었다(Table 2). 분자진단기술을 이용하여 다양한 식품에서 병원성 미생물을 검출하기 위해 DNA를 추출할 때 boiling 방법을 사용하는 것이 상용화된 DNA 추출 키트와 DNA 순도는 비슷하고 비용은 더 저렴한 것으로 보고된 바 있다[42,43)]. Fregel 등

Table 2. Salinity before and after DNA extraction of shellfish samples and PCR results using extracted DNA

Shellfish	Salinity concentration (%)		
	Before DNA extraction	After extraction	PCR results
Scallop (*Argopecten nucleus*)	4.48±0.50		
Oyster (*Crassostrea gigas*)	3.96±0.50		
Venus clam (*Arctica islandica*)	4.01±0.17		
Sakhalin surf clam (*Spisula sachalinensis*)	5.03±0.01	0.00	+
Mussel (*Mytilus coruccus*)	6.23±1.27		
Clam (*Pseudocardium sachalinensis*)	4.67±0.59		
Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)	4.01±0.00		

[44] 및 Schlaak 등[45]의 연구에서도 DNA 추출 시 알코올 침전 등의 추가 과정을 통해 시료 중 포함된 염 농도가 감소하여 탈염 효과가 보고되었으나, 본 연구에서는 boiling 후 binding column을 이용하여 단시간에 탈염과 DNA 추출을 동시 수행하였다. 따라서 본 연구에 사용된 DNA 추출 방법은 간단하고 신속하며 소요되는 비용이 더 저렴하며 현장에서 효과적으로 사용할 수 있는 잠재력이 있다고 판단된다.

인공위적으로 감염시킨 홍합 시료를 이용한 전처리 방법의 검증

수산물 시료 중 *Salmonella* spp.의 검출을 목적으로 사용된 전배양과 DNA 추출 방법의 검증을 위해 홍합시료(멸균 또는 비멸균)에 *Salmonella* spp.를 인위적으로 약 10^0, 10^1 및 10^2 CFU/g의 농도로 오염시킨 후 전배양과 DNA 추출 과정을 수행한 후 PCR로 특이적 증폭 밴드의 여부를 확인하였다(Table 3, 4). 홍합 시료 중 오염된 *Salmonella* spp.의 2시간 동안의 증균 효율은 endogenous microbiota의 영향을 배제하기 위해 멸균된 홍합시료에 *Salmonella*

Table 3. Results of viable cell count after pre-culturing in 2 h according to initial cell concentration of autoclaved mussels

Species	Initial concentration (log CFU/mL)	Viable cell count (log CFU/mL)			
		Before culture	After 1 h	After 2 h	Increase value
S. Typhimurium	0.00-0.99	0.16±0.17 [b1,2)]	0.29±0.23 [b]	1.18±0.10 [a]	1.02±0.02
	1.00-1.99	1.25±0.16 [c]	1.37±0.19 [b]	2.17±0.20 [a]	0.92±0.03
	2.00-2.99	2.25±0.06 [c]	2.35±0.16 [b]	3.15±0.13 [a]	0.90±0.02
S. Enteritidis	0.00-0.99	0.40±0.15 [c]	0.67±0.17 [b]	1.66±0.07 [a]	1.26±0.10
	1.00-1.99	1.33±0.09 [c]	1.66±0.12 [b]	2.57±0.10 [a]	1.24±0.08
	2.00-2.99	2.36±0.11 [c]	2.64±0.05 [b]	3.66±0.08 [a]	1.27±0.04
S. Enterica	0.00-0.99	0.50±0.12 [c]	0.62±0.19 [b]	1.42±0.12 [a]	0.91±0.01
	1.00-1.99	1.43±0.15 [c]	1.66±0.12 [b]	2.33±0.15 [a]	0.92±0.03
	2.00-2.99	2.46±0.07 [c]	2.63±0.06 [b]	3.37±0.13 [a]	0.90±0.01
S. Derby	0.00-0.99	0.80±0.13 [b]	0.92±0.17 [b]	1.93±0.11 [a]	1.12±0.04
	1.00-1.99	1.72±0.09 [c]	1.89±0.05 [b]	2.82±0.07 [a]	1.10±0.01
	2.00-2.99	2.71±0.11 [c]	2.93±0.09 [b]	3.88±0.10 [a]	1.17±0.03
S. Bovismorbificans	0.00-0.99	0.78±0.17 [b]	0.91±0.17 [b]	1.92±0.11 [a]	1.10±0.02
	1.00-1.99	1.84±0.07 [b]	1.91±0.11 [b]	2.92±0.16 [a]	1.09±0.11
	2.00-2.99	2.76±0.10 [b]	2.90±0.21 [b]	3.84±0.18 [a]	1.15±0.05

[1)] Values are means±SD.
[2)] Values sharing the same lowercase letter within a row are not significantly different at $P<0.05$.

Table 4. PCR detection of artificially contaminated mussels for 5 types of *Salmonella* spp. using pre-culture and DNA extraction

Species	Samples (mussels)	Results of PCR detection (initial concentration CFU/g)								
		10^0 CFU/g			10^1 CFU/g			10^2 CFU/g		
		0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
S. Typhimurium	Autoclaved	-[1)]	-	+	+	+	+	+	+	+
	Non-autoclaved	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. Enteritidis	Autoclaved	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Non-autoclaved	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. Enterica	Autoclaved	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Non-autoclaved	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Derby	Autoclaved	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Non-autoclaved	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Bovismorbificans	Autoclaved	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Non-autoclaved	-	-	+	+	+	+	+	+	+

[1)] +, positive results in PCR; -, negative results in PCR.

spp. 5종을 인공오염 시킨 후 수행되었으며, 결과적으로 *Salmonella* spp. 균체만을 이용한 증균 결과와 유사하게 2시간 동안 약 1 log CFU/g이 증균된 것으로 나타났다(Table 3). 또한, *Salmonella* spp. 5종을 인위적으로 오염시킨 혼합 시료의 증균 시간별 PCR 결과를 Table 4에 나타내었다. 멸균 처리 여부와 상관없이 *S.* Enterica 및 *S.* Derby를 오염시킨 혼합 시료는 모든 조건에서 양성으로 나타났으며, *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis 및 *S.* Bovismorbificans가 10^0 CFU/g 농도로 오염된 혼합시료는 0 h 및 1 h 증균 한 경우는 음성으로 나타났지만, 2 h 증균 한 경우에서는 모든 농도에서 양성으로 나타났다. 이는 배양액과 달리 혼합 시료에 존재하는 glycogen 및 polysaccharides 등의 다당류 및 단백질 등이 PCR inhibitor로 작용하여 저농도의 *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis 및 *S.* Bovismorbificans를 검출하지 못한 것으로 사료된다[46,47]. *Salmonella* spp. 5종이 10^1 및 10^2 CFU/g의 농도로 오염된 혼합 시료들은 모두 증균 시간과 관계없이 PCR에서 특이적인 양성 밴드를 나타내었으며, 이는 수산물 시료 중 약 1 log CFU/g 이상의 *Salmonella* spp.가 오염되어 있을 경우 검출 확률이 있다는 것을 의미할 수 있다.

본 연구결과와 같이 분자진단법을 이용하여 식품으로부터 낮은 농도의 병원성 미생물을 검출 시 전배양을 통하여 병원성 미생물의 농도를 증가시켜 검출 감도를 증가시키고 수산물 처리 현장에 적용시키기 위한 다양한 연구가 선행되어 왔다. 특히, Hahm 등[48], Ku 등[49] 및 Murakami[50]의 연구에서는 전배양에 3-6시간이 소요되었으며, 전배양이 끝난 식품의 검출 결과를 도출하는 시간까지 7-8시간이 소요되었다고 보고하였다. Yang 등[51]은 현장에서 수산물 중 오염된 *Vibrio vulnificus*를 검출하기 위해 recombinase polymerase amplification (RPA)과 lateral flow strip을 개발하였으며, 1 CFU/10 g의 민감도를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구의 결과는 기존의 긴 시간이 소요되던 전처리 과정의 단축과 전문인력이 필요한 DNA 추출 과정을 단순화할 수 있는 가능성을 보여주었으며, 본 연구에서 개발한 전처리 방법을 RPA 등의 시각적인 유전자 증폭 기반 분자생물학적 방법에 적용하여 *Salmonella* spp.를 현장적용성을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 패류 시료에 오염된 *Salmonella* spp.를 분자생물학적 방법으로 검출을 위한 비용과 시간을 절감할 수 있는 경제적인 방법의 하나로써 적용될 수 있음을 사사한다.

Acknowledgement

이 논문은 2023년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(20210695 수산물 신선유통 스마트 기술개발). 이 논문은 2020년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(20200377 수산 환경 및 수산물 중 미생물학적 위해요소 현장형 진단시스템 개발).

국문요약

본 연구에서는 수산물 시료 중 *Salmonella* spp. 검출을 위해 단시간의 전배양(2시간 이내)과 탈염과정을 포함한 DNA 추출법을 사용하여 분자생물학적 검출을 위한 수산물 전처리 방법에 대해 연구하였다. 배양 시간에 따른 증균 효율을 탐색하기 위해 10^0, 10^1 및 10^2 CFU/mL농도의 *Salmonella* spp. 5종을 NB 0.5에 접종하여 증균 전, 1시간 및 2시간 동안의 증균 효율을 비교하였다. 그 결과, 2시간 동안 모든 농도에서 약 1 log CFU/mL가 증균되어 초기 농도와 유의적인 차이가 나타났다. 또한 지역별 패류시료에 *S.* Typhimurium을 인위적으로 감염시킨 뒤 DNA를 추출하여 염농도를 측정한 결과, 모든 시료의 염농도가 0%로 DNA 추출과 동시에 탈염이 이루어진 것을 확인하였다. 이후 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 수행한 결과 모든 시료에서 *S.* Typhimurium의 특이적 양성 밴드가 확인되었다. 다음으로 수산물 시료 중 *Salmonella* spp. 검출을 위한 증균 과정과 탈염을 포함한 DNA 추출 방법의 검증을 위해 멸균 혼합시료 및 비멸균 혼합시료에 *Salmonella* spp. 5종을 인공적으로 약 10^0, 10^1, 10^2 CFU/g의 농도로 오염시켜 전배양과 DNA를 추출하여 PCR로 특이적 증폭 밴드의 여부를 확인한 결과, 모든 농도의 *Salmonella* spp. 5종에서 특이적 밴드가 확인되었다. 결과적으로 본 연구에서 제시한 전배양 및 DNA 추출 방법을 포함한 전처리 방법과 PCR을 사용하여 수산물 시료에서 10 CFU/g 미만의 *Salmonella* spp.를 검출하였으며, 시간과 비용면에서 효율적이며 과정이 복잡하기 않기 때문에 수산물의 처리 현장에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Confilct of interest

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Ye-Jun Song https://orcid.org/0000-0003-4116-6253
Kyung-Jin Cho https://orcid.org/0009-0005-1976-4793
Eun-Ik Son https://orcid.org/0000-0001-5754-2415
Du-Min Jo https://orcid.org/0000-0002-1257-1463
Young-Mog Kim https://orcid.org/0000-0002-2465-8013
Seul-Ki Park https://orcid.org/0000-0002-4304-5247

References

1. Grimont, P.A., Weill, F.X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, ninth ed. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, Paris, France, pp. 1-166.
2. Ranieri, M. L., Shi, C., Moreno Switt, A. I., Den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization for *Salmonella* serovar prediction. *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 1786-1797 (2013).
3. Foley, S. L., Lynne, A. M., Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.*, **86**, E173-E187 (2008).
4. Eady, M., Park, B., Rapid identification of *Salmonella* serotypes through hyperspectral microscopy with different lighting sources. *J. Spectr. Imaging.*, **5**, 1-10 (2016).
5. Silva, N.F., Magalhães, J.M., Freire, C., Delerue-Matos, C., Electrochemical biosensors for *Salmonella*: State of the art and challenges in food safety assessment. *Biosens.*, **99**, 667-682 (2018).
6. Atwill, E.R., Jeamsripong, S., Bacterial diversity and potential risk factors associated with *Salmonella* contamination of seafood products sold in retail markets in Bangkok, Thailand. *PeerJ*, **9**, e12694 (2021).
7. Prabhakar, P., Lekshmi, M., Ammini, P., Nayak, B.B., Kumar, S., *Salmonella* contamination of seafood in landing centers and retail markets of Mumbai, India. *J. AOAC Int.*, **103**, 1361-1365 (2020).
8. Zhao, X., Zhang, J., Duan, Y., Wan, Q., Zhang, X., Chen, J., Shi, C., Gao, Y., Ma, C., An ultra-fast, one-step RNA amplification method for the detection of *Salmonella* in seafood. *Anal. Methods*, **14**, 1111-1116 (2022).
9. Park, S.Y., Lee, K.D., Lee, J.S., Heu, M.S., Lee, T.G., Kim, J.S., Chemical and biological properties on sanitary of cultured oyster *Crassostrea gigas* intended for raw consumption or use in seafood products. *Fish. Aquat. Sci.*, **50**, 335-342 (2017).
10. Lee, S.J., Jeong, W.G., Koo, J.H., Kwon, J.N., Sanitary characteristics of seawater and oyster (*Crassostrea gigas*) in Goseong Bay, Korea. *Korean J. Malacol*., **32**, 157-164 (2016).
11. Sahu, B., Singh, S.D., Behera, B.K., Panda, S.K., Das, A., Parida, P.K., Rapid detection of *Salmonella* contamination in seafoods using multiplex PCR. *Braz. J. Microbiol.*, **50**, 807-816 (2019).
12. Betts, R., De Blackburn, C.W., 2009. Detecting pathogens in food, Foodborne Pathogens second ed., *Woodhead Publishing.* Cambridge, UK, pp. 17-65.
13. Lee, K.M., Runyon, M., Herrman, T.J., Phillips, R., Hsieh, J., Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, **47**, 264-276 (2015).
14. Bell, R.L., Jarvis, K.G., Ottesen, A.R., McFarland, M.A., Brown, E.W., Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. *Microb. Biotechnol.*, **9**, 279-292 (2016).
15. Liu, H., Srinivas, S., He, X., Gong, G., Dai, C., Feng, Y. Chen X., Wang, S., Quorum sensing in *Vibrio* and its relevance to bacterial virulence. *J. Bacteriol. Parasitol.*, **4**, 3 (2013).
16. Foo, P.C., Nurul Najian, A.B., Muhamad, N.A., Ahamad, M., Mohamed, M., Yean Yean, C., Lim, B.H., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: a comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample. *BMC biotechnology*, **20**, 1-15 (2020).
17. Rahn, K, De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galan, J.E., Ginocchio, C., Curtiss, R., Gyles, C.L., Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes*., **6**, 271-279 (1992).
18. Benoit, P.W., Donahue, D.W., Methods for rapid separation and concentration of bacteria in food that bypass time-consuming cultural enrichment. *J. Food Prot.,* **66**, 1935-1948 (2003).
19. Lampel, K.A., Orlandi, P.A., Kornegay, L., Improved template preparation for PCR-based assays for detection of foodborne bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4539-4542 (2000).
20. Brewster, J.D., Large-volume filtration for recovery and concentration of *Escherichia coli* O157: H7 from ground beef. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, **17**, 242-256 (2009).
21. Kim, J. H., Oh, S.W., Optimization of bacterial concentration by filtration for rapid detection of foodborne *Escherichia coli* O157: H7 using real-time PCR without microbial culture enrichment. *J. Food Sci.*, **84**, 3241-3245 (2009).
22. Kumar, R., Surendran, P.K., Thampuran, N., An eight-hour PCR-based technique for detection of *Salmonella* serovars in seafood. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 627-631 (2008).
23. Choi, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Lee, J., Ha, J., Oh H., Yoon, Y., Comparison of upgraded methods for detecting pathogenic *Escherichia coli* in foods using centrifugation or filtration. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, **37**, 799-803 (2017).
24. Wei, S., Park, B.J., Kim, S.H., Seo, K.H., Jin, Y.G., Oh, D.H., Detection of *Listeria monocytogenes* using Dynabeads® anti-Listeria combined with real-time PCR in soybean sprouts. *LWT*, **99**, 533-539 (2019).
25. Stevens, K.A., Jaykus, L.A., Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review. *Crit. Rev. Microbiol.,* **30**, 7-24 (2004).
26. Zheng, Q., Mikš-Krajnik, M., Yang, Y., Lee, S.M., Lee, S.C., Yuk, H.G., Evaluation of real-time PCR coupled with immunomagnetic separation or centrifugation for the detection of healthy and sanitizer-injured *Salmonella* spp. on mung bean sprouts. *Int. J. Food Microbiol.*, **222**, 48-55 (2016).
27. Momin, K.M., Milton, A.A.P., Ghatak, S., Thomas, S.C.,

Priya, G.B., Das, S., Shakuntala I., Sanjukta R., Puro K., Sen, A., Development of a novel and rapid polymerase spiral reaction (PSR) assay to detect *Salmonella* in pork and pork products. *Mol. Cell. Probes.*, **50**, 101510 (2020).
28. Asai, Y., Kaneko, M., Ohtsuka, K., Morita, Y., Kaneko, S., Noda, H., Furukawa, I., Takatori, K., Hara-Kudo, Y., *Salmonella* prevalence in seafood imported into Japan. *J. Food Prot*., **71**, 1460-1464 (2008).
29. Huang, Y., Ghate, V., Phua, L., Yuk, H.G., Prevalence of *Salmonella* and *Vibrio* spp. in seafood products sold in Singapore. *J. Food Prot.*, **75**, 1320-1323 (2012).
30. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2023, March 3). Korean Food Standards Codex. Retrieved from https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/.
31. Taminiau, B., Korsak, N., Lemaire, C., Delcenserie, V., Daube, G., Validation of real-time PCR for detection of six major pathogens in seafood products. *Food Control*, **44**, 130-137 (2014).
32. Mahmoud, N.E., Altayb, H.N., Gurashi, R.M., Detection of carbapenem-resistant genes in *Escherichia coli* isolated from drinking water in Khartoum, Sudan. *J. Environ. Public Health*, **6**, 2571293 (2020).
33. Ahmed, O.B., Dablool, A.S., Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in gram negative bacteria. *Int. J. Bioassays*, **6**, 5347-5349 (2017).
34. Schrader, C, Schielke, A, Ellerbroek, L, Johne, R., PCR inhibitors–occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.*, **113**, 1014-1026 (2012).
35. Yanestria, S.M., Rahmaniar, R.P., Wibisono, F.J., Effendi, M.H., Detection of *invA* gene of *Salmonella* from milkfish (*Chanos chanos*) at Sidoarjo wet fish market, Indonesia, using polymerase chain reaction technique. *Vet. World*, **12**, 170-175 (2019).
36. Liu, H., Whitehouse, C.A., Li, B., Presence and persistence of Salmonella in water: the impact on microbial quality of water and food safety. *Front. Public Health*, **6**, 159 (2018).
37. Dhakal, J., Sharma, C.S., Nannapaneni, R., McDANIEL, C.D., Kim, T., Kiess, A., Effect of chlorine-induced sublethal oxidative stress on the biofilm-forming ability of *Salmonella* at different temperatures, nutrient conditions, and substrates. *J. Food Prot.*, **82**, 78-92 (2019).
38. Ledeboer, N.A., Frye, J.G., McClelland, M., Jones, B.D., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect. Immun.*, **74**, 3156-3169 (2006).
39. Ma, K., Deng, Y., Bai, Y., Xu, D., Chen, E., Wu, H., Li, B., Gao, L., Rapid and simultaneous detection of *Salmonella, Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control*, **42**, 87-93 (2014).
40. Kim, E., Choi, C.H., Yang, S.M., Shin, M.K., Kim, H.Y., Rapid identification and absolute quantitation of zero tolerance-*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thompson using droplet digital polymerase chain reaction. *LWT*, **173**, 114333 (2023).
41. Shamloo, E., Hosseini, H., Moghadam, Z.A., Larsen, M.H., Haslberger, A., Alebouyeh, M., Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iran. J. Vet. Res.*, **20**, 241-254 (2019).
42. Improvement of the detection technique of Listeria monocytogenes through modification of the enrichment medium and DNA extraction buffer. *J. Food Hyg. Saf.*, **35**, 334-340 (2020).
43. Omar, B.A., Atif, H.A., Mogahid, M.E., Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **8**, 598-602 (2014).
44. Fregel, R., González, A., Cabrera, V.M., Improved ethanol precipitation of DNA. *Electrophoresis*, **31**, 1350-1352 (2010).
45. Schlaak, C., Hoffmann, P., May, K., Weimann, A., Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 1003-1005 (2005).
46. Atmar, R.L., Metcalf, T.G., Neill, F.H., Estes, M.K., Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 631-635 (1993).
47. Richards, G.P., Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *J. Food Prot.*, **62**, 691-697 (1999).
48. Hahm, B.K., Kim, H., Singh, A.K., Bhunia, A.K., Pathogen enrichment device (PED) enables one-step growth, enrichment and separation of pathogen from food matrices for detection using bioanalytical platforms. *J. Microbiol. Methods*, **117**, 64-73 (2015).
49. Ku, S., Ximenes, E., Kreke, T., Foster, K., Couetil, J.L., Zuponcic, J., Zhao, X., Hoagland, L., Deering, A.J., Ladisch, M.R., Microbial enrichment and multiplexed microfiltration for accelerated detection of *Salmonella* in spinach. *Biotechnol. Prog*., **35**, e2874 (2019).
50. Murakami, T., Filter-based pathogen enrichment technology for detection of multiple viable foodborne pathogens in 1 day. *J. Food Prot.*, **75**, 1603-1610 (2012).
51. Yang, X., Zhao, P., Dong, Y., Chen, S., Shen, H., Jiang, G., Zhu, H., Dong J., Gao, S., An isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow strip combined method for rapid on-site detection of *Vibrio vulnificus* in raw seafood. *Food Microbiol*., **98**, 103664 (2021).