



ORIGINAL ARTICLE

Comparison of Optimal Storage Temperature and Collection Reagents for Living Bacterial Cells in Swab Samples

Yeong Ju Lee¹, Hee Sang You², Song Hee Lee¹, So Lip Lee², Han Lee³, Ho Joong Sung^{1,2,3}, Hee Gyo Kang^{1,2,3}, Sung Hee Hyun^{1,2,3}¹Department of Biomedical Laboratory Science, Graduate School, Eulji University, Uijeongbu, Korea²Department of Senior Healthcare, BK21 Plus Program, Graduate School, Eulji University, Uijeongbu, Korea³Department of Biomedical Laboratory Science, Eulji University, Uijeongbu, Korea

면봉시료에서 세균의 보존을 위한 최적 보관 온도와 채취 시약의 비교

이영주¹, 유희상², 이송희¹, 이소립², 이 한³, 성호중^{1,2,3}, 강희규^{1,2,3}, 현성희^{1,2,3}¹을지대학교대학원 임상병리학과, ²을지대학교대학원 BK21 프로그램 시니어헬스케어학과, ³을지대학교 임상병리학과

ARTICLE INFO

Received October 22, 2021
Revised 1st November 19, 2021
Revised 2nd December 2, 2021
Accepted December 2, 2021

Key words

Colony forming units
Relative light units
Sampling
Swab
Tris-EDTA

ABSTRACT

Swabs are useful and common sampling tools in various research fields, such as medicine, ecology, biotechnology, forensic medicine, and pollutant monitoring systems. Collection reagents are one of the essential components in sampling. It is important to develop a sample collection kit and designate an appropriate storage temperature because samples need to be stored for a long time. The purpose of this study was to identify the effects of three collection reagents and three storage temperatures on the recovery of living bacteria without media. We selected *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as representative environmental bacteria. Distilled water (DW), phosphate buffered saline (PBS), and Tris-EDTA (TE) buffer were used as collection reagents and stored at 22°C, 4°C, and -70°C after sampling. The results of using each collection reagent and storage temperature on the bacteria were compared using relative light units (RLU) and the number of colony forming units (CFU). When using -70°C storage temperature and the TE buffer, the number of living bacteria and the RLU values remained constant. It is therefore recommended that the sample be stored at -70°C immediately after collection and a TE buffer solution be used as the collection reagent.

Copyright © 2021 The Korean Society for Clinical Laboratory Science.

서론

미생물의 샘플링은 미생물 계수 및 동정을 통해 진행하는 자연환경, 위생 검사, 진단 검사 등 평가에 핵심적이다[1]. 효과적인 미생물 채취를 위해서 채취 방법, 보관 방법이 중요하며

[2-4], 일반적으로 미생물의 검출을 위해 집락형성단위(CFU, colony forming units)와 ATP 법이 적용된다[4, 5]. 면봉은 미생물 샘플링에 권장되어 왔으며, 연구마다 선택할 수 있는 여러 종류의 면봉이 존재한다[1]. Flocked wide swab은 실험 결과에 영향을 미치며, nylon flocked swab과 foam swab이 cotton swab과 비교했을 때 고체 표면의 미생물, 바이러스, DNA 수집에 우수한 것으로 알려져 있다[1]. 특히 여러 연구에서 nylon 재질의 면봉은 세균, 바이러스 등 미생물 채취를 위해 개발된 면봉으로 샘플링에 적합한 면봉으로 사용된다[3].

많은 연구에서 그람음성균과 그람양성균의 대표적인 환경 미

Corresponding author: Sung Hee Hyun

Department of Biomedical Laboratory Science, Eulji University, Dongilro 712, Uijeongbu 11759, Korea

E-mail: hyumsh@eulji.ac.krORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8980-1036>

생물로 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*가 이용된다[4]. 그람음성균 외막의 성분인 내독소 때문에 소독된 장비와 기구 등에 포함되지 않도록 권장하는 오염균으로 분류되고 있으며[6], 의료 환경에서 획득되는 임상 감염의 흔한 원인균으로 분류되고 있다[2]. *E. coli*는 오염의 척도를 나타내는 균주이며, 대표적으로 식품위생과 수질의 위생 상태를 나타내는 지표 미생물로 이용되고 있다.

면봉 샘플링과 함께 사용되는 채취 시약에 따라서도 샘플링 결과가 달라질 수 있다[3]. TE buffer와 PBS는 DNA와 단백질 추출 및 분석까지 시료를 보존하는 데 유용하게 사용되는 시약이다[7, 8]. 분자생물학 연구에서 사용되는 TE buffer는 핵산 보존에 중요한 역할을 한다. TE buffer에 포함된 Tris는 완충작용의 역할을 하며, EDTA는 DNase로부터 DNA를 보호하는 기능을 한다. 이러한 특성 때문에, TE buffer는 주로 시료를 보존하는 시약으로 사용된다. 이 연구에서 사용한 TE buffer의 조성 및 비율은 이전 연구에서 실험되어 입증된 TE buffer 조성으로 사용하였다[9]. PBS는 특정 pH 조건을 유지하는 데 도움이 되기 때문에 생물학적 연구에서 많이 이용되고 있다.

일정 기간 시료의 보존을 위해서 일반적으로 냉장 보관, 냉동 보관, 초저온 냉동보관 등의 방법이 사용된다[10]. 4°C와 -20°C 이하의 보관 온도는 게놈 및 플라스미드 DNA를 단기 또는 장기로 저장할 수 있으며, 면봉을 사용하여 채취한 시료를 -70°C에서 보관할 때 시간의 흐름에 따라 큰 감소가 없다는 결과는 이전 연구로 입증된 사실이다[2]. 이전 연구에 따르면 낮은 온도에서 보관하는 것이 높은 온도에서 보관하는 것보다 시료의 안정성이 잘 유지되는 이유는 DNA를 실온 및 높은 온도에 노출시키면 분해가 유도되기 때문이다[8]. 미생물의 생존을 측정하는 이전 연구에서 *E. coli*는 최대 3개월, *S. aureus*는 최대 3주 동안 실험이 진행되었다[12, 13].

살아있는 유기체는 ATP를 에너지원으로 사용하며, ATP 측정을 위해 Luciferin과 Luciferase를 이용한다. 측정된 ATP 양은 상대적인 빛의 양으로 환산되며, 그 단위를 상대적 발광 단위(RLU, relative light units)로 표현한다. CFUs 측정은 생존하는 미생물의 집락 수를 측정하는 것이다. 일반적으로 우무 평판 배지에 도말하고 배양하여 증식된 미생물의 집락 수를 계수한다. ATP 측정은 의료 시설, 의약품, 의료기기 제조시설, 동물실험연구소, 식품 제조시설 등 무균환경이 필수적인 곳에서 위생 상태를 모니터링을 하기 위한 방법으로 이용된다[6, 14, 15]. 간접 측정법인 ATP 검출 결과와 살아있는 세균의 집락 수가 일관되지 않은 상관관계를 보인다는 이전 연구들이 있으며[6, 14, 15], 이 연구에서 CFUs 결과와 함께 ATP 검출을 통해 상관성을

확인하였다.

장기간 보관되는 균에 대한 수송 배지의 효과는 많이 연구되어 왔다. 그러나 수송 배지의 사용은 연구에 상당한 비용을 차지하고, 샘플링한 균이 증식할 수 있는 환경을 제공하기 때문에 정량분석에는 적절하지 않다. 따라서 본 연구에서는 원래 시료에 존재하는 상태를 그대로 유지할 수 있는 조건을 확인하기 위해 nylon 재질의 면봉으로 시료를 채취하고 3가지 채취 용액과 22°C, 4°C, -70°C 보관 온도에서 시간 경과에 따라 ATP와 CFUs의 결과를 비교해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양

Brain heart infusion agar (BHIA) (Difco, Bitek; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 *E. coli* (KACC 11598)와 *S. aureus* (KACC 10768)를 접종하여 CO₂ 배양기(Heraeus Instruments, Hanau, Germany)에서 36.5°C의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. *E. coli*는 2개 집락, *S. aureus*는 1개 집락을 채취하여 각각 100 mL의 멸균된 Luria-Bertani broth (Difco, Bitek; Becton, Dickinson and Company)에 접종하여 36.5°C, 140 rpm/min의 진탕 배양기(JEIO TECH, ISF-7100, Daejeon, Korea)에서 15시간 동안 배양하였다. 이후 UV/Vis spectrophotometer (Optizen POP, KLAB, Daejeon, Korea)의 single wavelength mode 600 nm 조건으로 *E. coli*, *S. aureus*의 Optical density (OD) 값을 각각 1.092, 1.138로 맞추어 실험을 진행하였다[16, 17]. 실험의 진행 과정은 Figure 1에 그림으로 나타내었다.

2. 시료의 채취

각각 배양된 세균의 용액을 멸균된 Falcon[®] tube (Corning Inc., NY, USA)에서 1:1 비율로 혼합하였으며, 멸균된 솜에 10 mL을 흡수시켜 책상에 도포하였다. 건조시키고 도포하는 과정을 총 3회 반복하였다. Swabbing의 반복 횟수를 3, 7, 20회 비교한 사전 실험을 토대로 총 20회로 진행하였다(Table S1). 사용된 책상 표면은 실험 전, 3일 동안 3회 알코올 소독과 DW로 세척하여 오염을 최소화하였다. 시료 채취에서 사용된 면봉은 flocced wide swab (Noble Biosciences Inc., Hwaseong, Korea)을 사용하였으며, 한 개의 면봉으로 세균이 도포된 책상 5×5 cm의 면적에서 채취를 진행하였다. 세균의 채취 용액으로 DW, PBS, Tris-EDTA 각각 150 µL씩 면봉에 흡수시켜 채취하였다. 채취 시약을 면봉에 흡수시키는 과정은 멸균된 유리 시럽

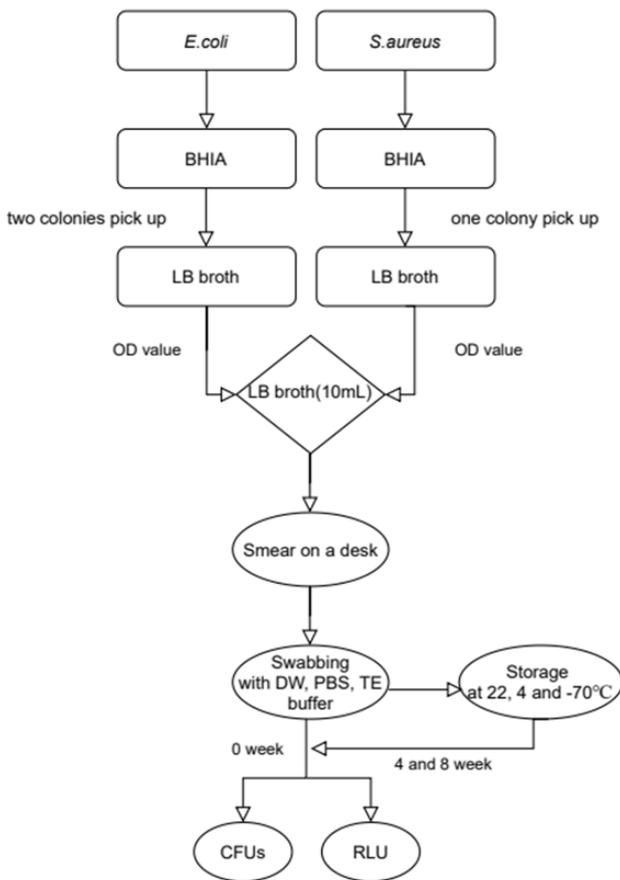


Figure 1. Each bacteria were cultured on BHIA and incubated at 37°C for 24 h. After that, two colonies of *E. coli* and one colony of *S. aureus* from BHIA were incubated in LB broth for 24 h at 37°C. 5 mL of *E. coli* in LB broth and 5 mL of *S. aureus* in LB broth were mixed. With sterilized cotton, we smeared the bacterial solution on a desk. The samples were swabbed from the 5x5 cm area of the substrates for each condition.

관에서 진행하였다. 채취한 면봉은 멸균된 튜브에 넣어 4°C, 22°C, -70°C에서 4주, 8주간 보관하였다. 0주는 모든 보관 온도와 시점에서 baseline이 되는 값으로 시료 채취를 진행한 수 1시간 이내로 실험하였다. 채취 시약으로 사용한 PBS는 sodium chloride (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 이용하여 제조하였으며, Tris-EDTA의 조성은 Tris 100 mM, EDTA 10 mM, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 1000 mM, pH 8.0이다[6].

3. 세균 수 계수(CFUs)

2.5 mL의 PBS에 채취한 면봉을 넣고 혼합하여 면봉에 존재하는 균을 최대한 분리하였다. 상층액을 1:6 연속 희석하여 MacConkey agar (Difco, Bitek; Becton, Dickinson and Company)와 Mannitol Salt agar (Difco, Bitek; Becton,

Dickinson and Company) 각각 3개의 평판배지에 100 µL씩 분주하고 도말하였다. CO₂ 배양기에서 36.5°C로 24시간, 48시간 동안 배양하였다[2, 18]. *E. coli*와 *S. aureus* 집락 수를 계수하였으며(Figure S1), 계수한 결과는 희석 배율과 CFUs/mL로 환산하여 결과를 산출하였다. 얻어진 값은 로그값으로 변환하였으며, 소수점 둘째자리까지 표기하였다.

4. ATP 생물 발광 분석

ATP는 BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA) 시약을 사용하여 측정하였으며, 제조업체의 지침대로 진행하였다[19]. 각 주차에서 ATP 측정은 면봉을 넣고 혼합이 이루어진 PBS를 사용하여 진행하였다 [19]. VICTOR×3 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 기기를 사용하여 RLU를 3회 반복 측정하였고 모든 RLU 값은 빈 well 값의 평균값을 뺀 값으로 나타내었다. 얻어진 값은 로그값으로 변환하였으며, 소수점 둘째자리까지 표기하였다.

5. 통계분석

Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 20.0, Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였다. 3회 반복 실험한 CFUs와 RLU 결과 데이터는 Pearson 상관계수를 활용하여 CFUs와 RLU 간의 상관관계를 분석하였다. 실험 결과는 GraphPad Prism (GraphPad Software version 6, San Diego, CA, USA)을 사용하여 그래프로 나타내었다. 표준편차를 쉽게 보기 위해 막대그래프를 활용하였고, 상관관계를 보기 위해 추세선을 추가한 분산도 그래프를 활용하였다.

결 과

1. 보관 온도와 채취 시약에 따른 ATP와 세균 수

보존시간 경과에 따른 채취 시약들의 RLU 값과 CFUs 값을 온도별로 비교 관찰하였다(Figure 2). 0주에서 채취 시약에 따른 RLU와 CFUs의 값은 0.06 Log RLU/mL, 0.36 Log CFUs/mL 이하의 차이를 나타냈다. 22°C에서 보관하였을 때 (Figure 2A, B), PBS를 제외한 TE, DW (Figure 2B)에서 감소하는 경향이 관찰되었다. 8주에서 DW는 2.27 (±0.02) Log RLU/mL, 2.89 (±0.085) Log CFUs/mL, PBS는 2.41 (±0.01) Log RLU/mL, 3.63 (±0.046) Log CFUs/mL, TE buffer는 2.41 (±0.009) Log RLU/mL, 3.86 (±0.057) Log CFUs/mL이며, TE buffer, PBS, DW 순으로 높게 관찰되었다. 4°C에서 보관하였을 때(Figure 2C, D), 8주에서는 DW, PBS,

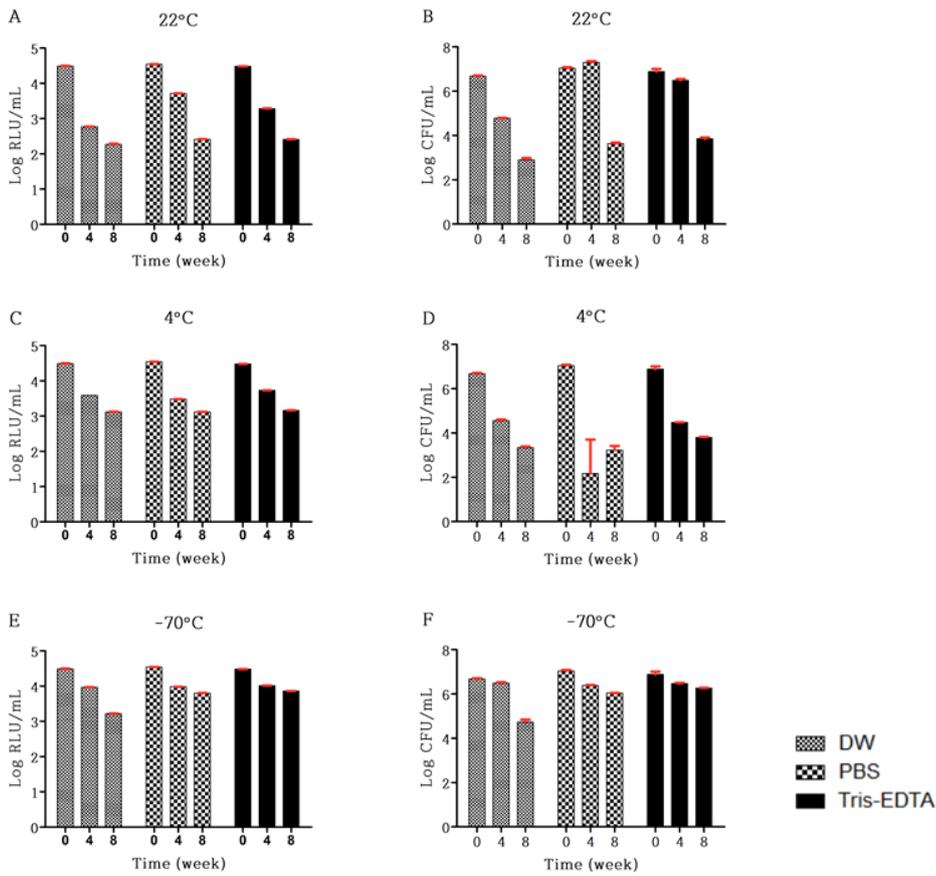


Figure 2. Bar graphs of RLU and CFU values of samples divided by storage temperatures. All resulting values were converted to logarithms. Figure A, C, E are signals detections of *E. coli* and *S. aureus* (Log RLU/mL±SD), Figure B, D, F are the number of colonies of *E. coli* and *S. aureus* (Log CFU/mL±SD). Each pattern represents the reagents.

TE buffer 순으로 3.12 (±0.008), 3.12 (±0.002), 3.16 (±0.004) Log RLU/mL (Figure 2C)로 관찰되었으며, 3.34 (±0.059), 3.22 (±0.194), 3.81 (±0.016) Log CFUs/mL (Figure 2D)의 생균 수가 측정되었다. 따라서 TE buffer, DW, PBS 순으로 높게 유지되었다. -70°C에서 보관하였을 때, RLU와 CFUs값을 나타낸 그래프이다(Figure 2E, F). 8주에서 DW, PBS, TE buffer 순으로 3.22 (±0.006), 3.80 (±0.006), 3.86 (±0.005) Log RLU/mL (Figure 2E), 4.73 (±0.11), 6.03 (±0.013), 6.27 (±0.008) Log CFUs/mL (Figure 2F)로 관찰되었으며, TE buffer, PBS, DW 순으로 높게 관찰되었다.

2. 채취 시약과 보관 온도에 따른 ATP와 세균 수의 상관관계 분석

ATP와 CFU 실험 결과를 기반으로 RLU와 CFU의 상관관계 비교를 위해 분산도를 분석하였다(Figure 3). DW를 사용하여 채취한 후, 22°C에서 보관하였을 때, Log RLU와 Log CFU값의 상관계수는 0.955이며, 4°C에서 보관하였을 때, 0.999, -70°C에서 0.945로 계산되었다. PBS로 채취한 후, 22°C에서 보관 시, 0.896, 4°C에서 보관 시, 0.827, -70°C에서 보관

시, 0.991로 계산되었다. TE buffer로 채취한 후 상관계수는 22°C에서 0.879, 4°C에서 0.971, -70°C에서 0.964로 측정되었다.

고 찰

시료의 효율적인 면봉 채취에 사용될 수 있는 시약 개발과 표준운영절차와 관련된 연구가 다양하게 진행되고 있다[1, 4, 9, 20, 21]. 이 연구에서는 면봉을 이용하여 시료를 채취함에 따라 적합한 시약과 8주까지 보관을 위한 적절한 온도를 비교하여 확인하였다. 시약의 종류와 보관 온도, 기간 비교를 통해 시료를 채취한 당시(0주) 결과와 시간 경과에 따라 얻는 결과와 유의한 차이가 없는 조건이 적절한 채취 시약과 보관 온도라고 할 수 있다. 채취 직후 결과인 0주에서는 PBS를 사용하여 채취하였을 때의 4.54 Log RLU/mL, 7.04 Log CFUs/mL로 세 가지 시약 중 가장 효율이 높았다. 채취 후 시료를 보관한 경우, 대부분 시약과 기간에서 -70°C에서 보관하였을 때 시료의 보존 및 유지가 잘 되었다. Baseline (0주)과 이 연구에서 가장 긴 시점인 8주를 비교했을 때, TE buffer는 -70°C 보관에서 6.27 Log CFUs/mL

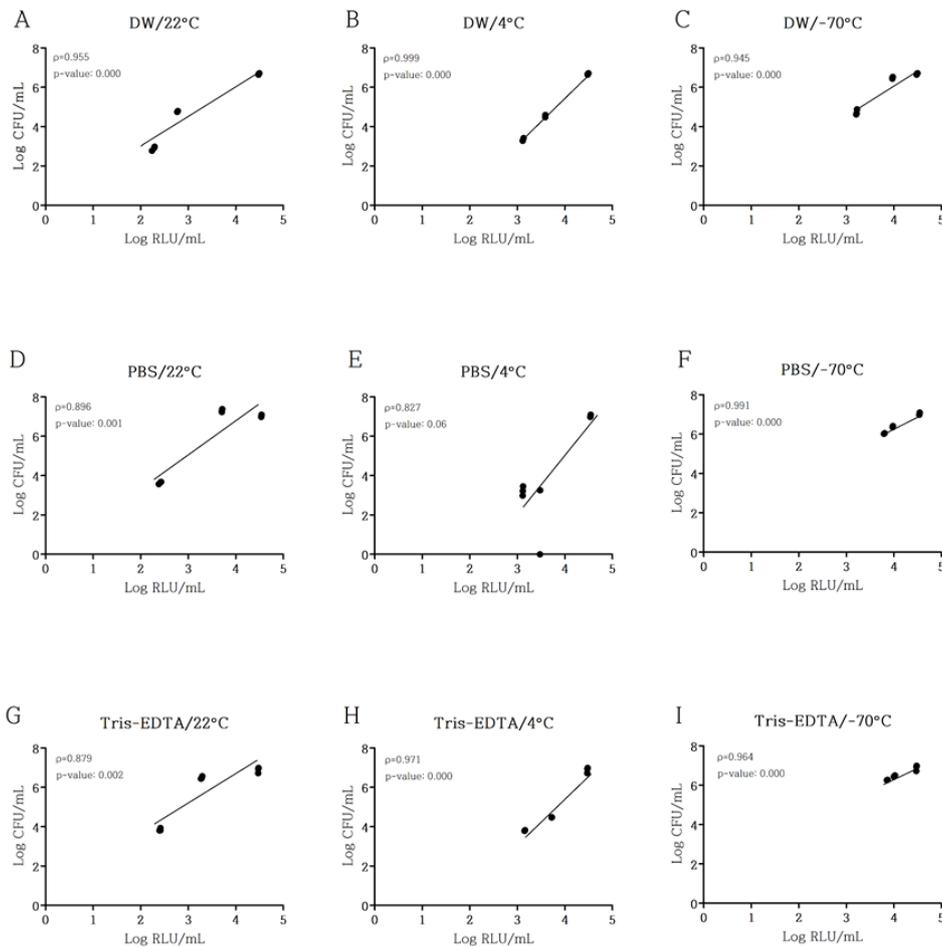


Figure 3. Scatterplot of ATP assay values (Log RLU/mL) and colony count (Log CFU/mL) of samples. Graph about correlation between RLU values and CFU values. All resulting values were converted to logarithms.

로 나타나 모든 채취 시약과 보관 온도 중에서 생균 수가 가장 적게 감소한 것을 관찰하였다(Figure 2). 또한 TE buffer를 사용하여 시료를 채취하고 -70°C 에서 보관한 결과가 DW와 PBS를 사용하여 -70°C 에서 보관한 결과보다 분산도의 plot 거리가 좁은 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 따라서 시료를 장기간 보관할 시엔 TE buffer를 사용하여 채취하는 방법이 생균 수 유지에 유리함을 확인할 수 있다. 또한 이 결과는 -70°C 에 보관하는 경우 별도의 운반 배지가 필요하지 않다는 이전 연구와 같은 결과를 도출할 수 있다[2].

CFUs와 DNA의 상관성 연구의 결과로부터[22], TE buffer의 결과는 DNase로부터 DNA를 보호하는 작용을 하여 핵산을 보존해주는 기능과 생균을 보존하는 완충작용이 있었음을 예상할 수 있다[9]. PBS는 이전 연구에서 높은 수준의 시료 보존력을 보인 것과 같이 이 연구에서도 일치한 결과가 확인되었다[9]. 그러나 22°C 와 4°C 에서 보관한 시료는 다른 실험에 사용된 채취 시약보다 큰 표준편차를 확인할 수 있었으며 유의한 변동을 확인할 수 있었다(Figure 2). PBS 용액은 시료의 pH를 유지하는

기능이 있으나, 본 연구에서는 시료의 pH를 연구 시점마다 측정하지 않아 pH가 일정하게 유지되었는지 알 수 없다. 시료의 pH 유지는 시료의 보존에 있어 중요한 부분이기 때문에, PBS 결과의 원인이 pH 변동일 것이라 추정된다. 또한 ATP 측정 시 pH 변화에 따라 luciferase와 luciferin 반응이 감소한다는 이전 연구 결과[23]와 같이 CFUs와 RLU의 상관성이 떨어졌을 것으로 추정된다. DW를 이용하여 채취하고 4°C 에서 4주까지 보관한 결과에서 생균 수는 4.56 Log CFU/mL 로 관찰되었으며, 같은 채취 시약으로 -70°C 에 4주까지 보관한 결과에서 생균 수는 6.49 Log CFUs/mL 로 관찰되었다. 같은 조건에서 보관된 다른 시약의 경우보다 $0.02\sim 2.4 \text{ Log CFUs/mL}$ 정도 높게 확인되었다. 본 연구에서 사용한 3차 증류수는 시약급 초순수 증류수로 양이온, 염기성 이온교환수지를 통과하면서 유기물과 이온이 최대한 제거되었기 때문에 시료에 미치는 영향이 적었던 것으로 예상된다[24].

ATP와 세균 수 결과를 바탕으로 생균 수 유지에 대한 두 결과의 상관관계도 확인하였다(Figure 3). ATP와 CFU의 상관관계

분석방법으로 Pearson 상관계수 분석이 다양하게 사용되며 [25, 26], ATP 검출 결과에서 CFU가 적을수록 두 값의 상관성이 부족하다는 연구 결과들이 많다[5, 6, 14, 27]. 따라서 ATP와 세균 수의 정확하지 않은 상관성 때문에 ATP의 한계와 검출 효과를 비교하는 연구는 현재까지 이어지고 있다[6, 28]. 본 연구에서도 세포 내 평균 ATP 함량 측정과 함께 CFUs 측정의 상관 관계를 확인하였다. 본 실험에서 ATP와 세균 수의 상관계수는 PBS를 사용하여 22°C, 4°C에서 보관했을 때와 TE buffer를 사용하여 22°C에서 보관했을 때를 제외하면 다른 모든 결과에서는 0.9 이상의 상관계수를 나타냈다(Figure 3). 각각의 조건 별로 상관분석을 하였을 때 높은 상관계수를 확인할 수 있었지만, 모든 ATP와 세균 수 결과에서의 상관분석은 0.73이라는 다른 결과에 비해 비교적 낮은 상관계수를 보였다.

대부분의 실험에서 시료를 보관할 때 초저온 냉동보관(-70°C)을 진행한다[2, 29]. 본 연구에서 실험한 22°C와 4°C는 초저온 냉동보관법과 비교 확인을 위해 실시하였다. 그 결과 22°C와 4°C를 비교했을 때 시간이 지남에 따라 CFU 값의 변동이 4°C에서 큰 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 냉장 보관 시, 시료를 보관하는 냉장고의 개폐로 인하여 안정적인 습도와 온도 유지가 이루어지지 않아 시료 상태가 불안정하여 이러한 결과가 나타났다고 볼 수 있다. 하지만 22°C에서 8주 이상 보관 시, PBS, TE buffer를 이용한 시료에서 곰팡이의 생장을 육안으로 확인하였기 때문에 장기적인 측면에서의 보관 온도는 22°C가 4°C보다 적합한 보관 온도라고 할 수 없다.

이 연구를 진행한 결과, 0, 4, 8주라는 시행 기간에 따라 CFU 실험을 위해 실시되는 균의 희석 배율을 조절하는 것이 중요했으며, 4주의 CFUs에서 첫 번째 희석단계인 시료를 사용하지 않았다는 점을 고려했을 때, MSA 배지에 0 세균 수가 나온 값은 실제로 시료의 값이 아닐 수 있다. 본 연구에서는 시료 채취 및 보관을 위한 효율적인 시약의 선택과 보관 온도 선택에 따른 샘플의 회수율을 평가하는 것이 주된 목표였다. 연구 결과, 초저온 냉동 보관을 통한 시료 보존은 TE buffer를 사용하여 채취 및 보관하는 것이 가장 효율적이었다. TE buffer는 RNA, DNA 보존에 있어 가장 일반적으로 이용되는 시약으로 분자생물학 관련 연구가 시행되는 실험실이라면 쉽게 구매 및 사용할 수 있어 연구 진행에서 간편한 방법으로 이용될 것으로 생각된다.

요약

면봉을 사용한 샘플링 방법은 의학, 생태학, 생명공학, 법의학 및 오염 정도 모니터링 시스템과 같은 다양한 연구 분야에서

유용하다. 샘플링에서 채취 시약은 중요한 요소 중 하나이다. 시료를 장기간 보관해야 하는 경우에는 시료 채취 키트와 시료 보관 온도가 매우 중요하다. 이 연구의 목적은 별도의 배지 없이, 세 가지 채취 시약과 세 가지 보관 온도가 살아있는 세균의 생균수에 미치는 영향을 확인하는 것이다. 대표적인 환경 세균으로 *E. coli*와 *S. aureus*를 선정하였다. 증류수(DW), 멸균된 인산염 완충액(PBS), Tris-EDTA (TE) 버퍼를 채취 시약으로 사용하여 샘플링한 후, 22, 4, -70°C에서 보관을 진행했다. 각 채취 시약 및 보관 온도가 시료에 미치는 영향은 RLU와 CFU로 결과로 비교하였다. -70°C 보관 온도와 TE 버퍼를 사용할 때 CFU와 RLU 값은 다른 조건에서보다 일정하게 유지되는 경향이 보였다. 따라서 이 연구는 시료가 채취 직후 -70°C에서 보관되어야 하며, 채취 시약으로 TE 버퍼와 함께 사용하는 것이 좋다는 것을 시사한다.

Acknowledgements: This research was supported and funded by the Korean National Police Agency. [Project Name: Development of bloodstain analysis system for scene reconstruction/Project Number: POLICE_I_00001_01_101]. This paper was supported by Eulji University in 2021

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Lee YJ¹, Graduate student; You HS², Graduate student; Lee SH¹, Graduate student; Lee SL², Graduate student; Lee H³, Undergraduate student; Sung HJ^{1,2,3}, Professor; Kang HG^{1,2,3}, Professor; Hyun SH^{1,2,3}, Professor.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data can be found with this article online at <https://doi.org/10.15324/kjcls.2021.53.4.326>.

REFERENCES

- Jansson L, Akel Y, Eriksson R, Lavander M, Hedman J. Impact of swab material on microbial surface sampling. *J Microbiol Methods*. 2020;176:106006. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106006>
- Panisello Yague D, Mihaljevic J, Mbegbu M, Wood CV, Hepp C, Kyman S, et al. Survival of *Staphylococcus aureus* on sampling swabs stored at different temperatures. *J Appl Microbiol*. 2021; 131:1030-1038. <https://doi.org/10.1111/jam.15023>

3. Zasada AA, Zacharczuk K, Woznica K, Glowka M, Ziolkowski R, Malinowska E. The influence of a swab type on the results of point-of-care tests. *AMB Express*. 2020;10:46. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-00978-9>
4. You HS, Lee SH, Ok YJ, Kang HG, Sung HJ, Lee JY, et al. Influence of swabbing solution and swab type on DNA recovery from rigid environmental surfaces. *J Microbiol Methods*. 2019;161:12-17. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.04.011>
5. Song YB, Ko SR, Kim CS, Kwak YS. Rapid microbiological assessment method by using ATP-bioluminescence in Ginseng powder. *J Ginseng Res*. 2001;25:127-129.
6. Turner DE, Daugherty EK, Altirer C, Maurer KJ. Efficacy and limitations of an ATP-based monitoring system. *J AM Assoc Lab Anim Sci*. 2010;49:190-195.
7. Kanoatov M, Krylov SN. Analysis of DNA in phosphate buffered saline using kinetic capillary electrophoresis. *Anal Chem*. 2016; 88:7421-7428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02117>
8. Ross KS, Haites NE, Kelly KF. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J Med Genet*. 1990;27:569-570. <https://doi.org/10.1136/jmg.27.9.569>
9. Lee HM, Yang JH, Gwon SY, Kang HG, Hyun SH, Lee JY, et al. Development of novel extraction reagents for analyzing dried blood spots from crime scenes. *Forensic Sci Int*. 2020;317: 110531. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110531>
10. Gosselt HR, Griffioen PH, van Zelst BD, Oosterom N, de Jonge R, Heil SG. Global DNA (hydroxy)methylation is stable over time under several storage conditions and temperatures. *Epigenetics*. 2021;16:45-53. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1786318>
11. Howlett SE, Castillo HS, Gioeni IJ, Robertson JM, Donfack J. Evaluation of DNA stable for DNA storage at ambient temperature. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;8:170-178. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.09.003>
12. Saliba R, Zahar JR, El Allaoui F, Carbonnelle E, Lescat M. Impact of freeze/thaw cycles and single freezing at -80 degrees on the viability of aerobic bacteria from rectal swabs performed with the ESwab(TM) system. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96:114895. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114895>
13. Delacour H, Van Cuyck H, Dubrous P, Soullie B, Leroy P, Koeck JL. Efficacy of a swab transport system in maintaining long-term viability of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65:345-346. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.07.011>
14. Smith PW, Sayles H, Hewlett A, Cavaliere RJ, Gibbs SG, Rupp ME. A study of three methods for assessment of hospital environmental cleaning. *Healthcare Infection*. 2013;18:80-85. <https://doi.org/10.1071/HI13001>
15. Kang HM, Eom YS, An HS, Kim CJ, Choi KH, Chung CI. Application of ATP Bioluminescence method for measurement of microbial contamination in raw meat, meat and dairy processing line. *J Food Hyg Saf*. 2000;15:252-255.
16. Romeo L, Lanza Cariccio V, Iori R, Rollin P, Bramanti P, Mazzon E. The α -cyclodextrin/moringin complex: a new promising antimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2018;23:2097. <https://doi.org/10.3390/molecules23092097>
17. Al-Qadiri HM, Al-Alami NI, Al-Holy MA, Rasco BA. Using Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine-induced bacterial injury in water. *J Agric Food Chem*. 2008;56:8992-8997. <https://doi.org/10.1021/jf801604p>
18. Aiken ZA, Wilson M, Pratten J, Epidemiology H. Evaluation of ATP bioluminescence assays for potential use in a hospital setting. *Infect. Control Hosp Epidemiol*. 2011;32:507-509. <https://doi.org/10.1086/659761>
19. Sule P, Wadhawan T, Wolfe A, Prüb B. Use of the BacTiter-Glo™ microbial cell viability assay to study bacterial attachment in biofilm formation. *Promega Notes*. 2008;99:19-21.
20. Hedman J, Akel Y, Jansson L, Hedell R, Wallmark N, Forsberg C, et al. Enhanced forensic DNA recovery with appropriate swabs and optimized swabbing technique. *Forensic Sci Int Genet*. 2021;53: 102491. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102491>
21. Verdon TJ, Mitchell RJ, van Oorschot RAH. Swabs as DNA collection devices for sampling different biological materials from different substrates. *J Forensic Sci*. 2014;59:1080-1089. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12427>
22. Low SXZ, Aw ZQ, Loo BZL, Lee KC, Oon JSH, Lee CH, et al. Viability of *Escherichia coli* ATCC 8739 in nutrient broth, luria-berthani broth and brain heart infusion over 11 weeks. *Electronic physician*. 2013;5:576-581. <https://doi.org/10.14661/2013.576-581>
23. Calvert R, Hopkins H, Reilly M, Forsythe S. Caged ATP—an internal calibration method for ATP bioluminescence assays. *Lett Appl Microbiol*. 2000;30:223-227. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00703.x>
24. Song-im N, Benson S, Lennard C. Evaluation of different sampling media for their potential use as a combined swab for the collection of both organic and inorganic explosive residues. *Forensic Sci Int*. 2012;222:102-110. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.05.006>
25. Gibbs SG, Sayles H, Colbert EM, Hewlett A, Chaika O, Smith PW. Evaluation of the relationship between the adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay and the presence of bacillus anthracis spores and vegetative cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11:5708-5719. <https://doi.org/10.3390/ijerph110605708>
26. Salsgiver E, Bernstein D, Simon MS, Greendyke W, Jia H, Robertson A, et al. Comparing the bioburden measured by adenosine triphosphate (ATP) luminescence technology to contact plate-based microbiologic sampling to assess the cleanliness of the patient care environment. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39:622-624. <https://doi.org/10.1017/ice.2018.39>
27. La Duc MT, Dekas A, Osman S, Moissl C, Newcombe D, Venkateswaran K. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:2600-2611. <https://doi.org/10.1128/AEM.03007-06>
28. Öz P, Arun ÖJF, Health. Evaluating the performance of ATP bioluminescence method by comparison with classical cultural method. *Food and Health*. 2019;5:77-82. <https://doi.org/10.3153/FH19008>
29. Smith S, Morin PA. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent. *J Forensic Sci*. 2005;50:1101-1108. <https://doi.org/10.1520/JFS2004411>