

해양 환경에서 분리된 *Vibrio vulnificus* biotype 2 균주의 특성 분석

김명석, 최낙중, 정현도*
국립수산과학원*부경대학교

서론

*V. vulnificus*는 그람음성 세균이며 기수와 해수에 널리 분포하고 있고 (Strom and Paranjpye, 2000) 표현형과 병원성에 의해 일반적으로 2개의 biotype으로 구분되는데 biotype 1은 사람에게 병원성이 있고 어패류에 병은 일으키지 않지만 서식을 한다. Biotype 2는 1982년 일본의 양식 뱀장어에서 처음 분리가 되었고 (Tison *et al.*, 1982) 사람에게 독성을 갖을 뿐 아니라 뱀장어에 병원성이 있고 패혈증을 일으킨다고 알려져 있으며 (Amaro *et al.*, 1996) indole test에서 음성을 나타내는 특징이 있다.

Biotype 2는 물을 매개로 뱀장어에 감염이 되기도 하며 (Noales *et al.*, 2001) 해수 중에서 50일 이상 생존이 가능하므로 (Biosca *et al.*, 1996) 해양환경에서 분리될 가능성이 높았지만 해양에서 분리된 경우는 드물었다.

본 연구에서는 남해안의 해수와 굴에서 분리한 *V. vulnificus* biotype 2를 PCR법에 의해 동정하였으며 생화학적 특성을 조사하였다. 그리고 분자생물학적 방법을 이용하여 다른 biotype 2 균주와 유전학적 차이를 조사하였으며 뱀장어에 대한 병원성을 비교하였다.

재료 및 방법

*V. vulnificus*의 분리, 동정: 2003년 8월에 남해, 하동지역의 해수, 저질, 굴을 채집하여 mCPC (modified Cellobiose- Polymyxin B-Colistin) 배지에 접종하고 40°C에서 24시간 배양 후 노란색 집락을 선택하였다. 분리된 세균은 PCR 법에 의해 동정과 분류를 하였으며 *V. vulnificus*의 동정과 16S rRNA type을 구분을 함께 할 수 있다고 보고된 Vib1, Vib2, Vib3R (Kim and Jeong, 2001)과 cytotoxin-hemolysin gene을 대상으로 제작된 Cyt1, Cyt2를 사용하였다.

RAPD-PCR 법에 의한 분류: R1 primer (5'-GCCACTTATG-3')로 pre-PCR 94°C 5분, denaturation 94°C 1분, annealing 37°C 1분, extension 72°C 1분 (45 cycles), 72°C 10분간 PCR을 실시하였고, 2.0% TAE agarose (with 0.5µg/ml EtBr), 0.5×

TAE buffer (with 0.5 μ g/ml EtBr)로 100V에서 30분간 전기영동하여 결과를 확인하였다.

생화학적, 생리적 특성 조사: 생화학적 성상은 API 20E kit (bioMerieux)를 사용하여 조사하였고 성장에 미치는 pH, NaCl, 온도의 영향을 조사하였다.

뱀장어에 대한 병원성과 혈청에서의 생존율: 평균체중 12.5g의 뱀장어의 복강에 세균을 주사하여 5% 인공해수에서 7일간 폐사 유무를 확인하였고 뱀장어 혈청에서의 *V. vulnificus* 균주의 생존율을 조사하였다.

결과 및 요약

남해안의 해수, 굴, 저질에서 분리한 *V. vulnificus* 75균주는 indole test에서 양성 반응을 나타내는 biotype 1의 71균주 (94.7%)와 음성 반응을 나타내는 biotype 2의 4균주 (5.3%) 이었다. biotype 2 균주는 해수에서 분리된 27균주 중 3균주, 굴에서 분리된 30균주 중 1균이었으며 저질에서는 분리되지 않았다. 16S rRNA type에 의한 구분에서 59균주 (78.7%)는 type A에 속하였고 16균주 (21.3%)는 type B에 속하였다.

해수와 굴에서 분리된 *V. vulnificus* biotype 2는 mannitol을 분해하여 뱀장어에서 분리된 다른 biotype 2 균주와 생화학적 특성의 차이가 있었다. RAPD-PCR에 의한 경향과 16S rRNA type도 다른 biotype 2 균주와 구별되어 유전적으로 차이가 있었다.

뱀장어에 대한 병원성은 동일하지 않았으며 병원성이 없는 biotype 2 균주가 발견되었고 뱀장어에 병원성이 없는 균주는 뱀장어 혈청에서 생존율이 낮았다.

참고 문헌

- Amaro, C. and E. Z. Biosca. 1996. *V. vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is an opportunistic pathogen for humans. Appl. Environ. Microbiol. 62. 1454-1457.
- Biosca, E. G., Amaro C., Noales E. M. and Oliver J. D. 1996. Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *V. vulnificus* biotype 2. Appl. Environ. Microbiol. 65. 1117-1126.
- Kim, M. S. and Jeong, H. D., 2001. Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *V. vulnificus* in marine environments. Aquaculture. 193, 199-211.
- Noales E. M., Milan M., Fouz B., Sanjuan E. and Amoro C. 2001. Transmission to eels, portals of entry, and putative reservoirs of *V. vulnificus* Serovar E (Biotype 2). Appl. Environ. Microbiol. 67. 4717-4725.
- Sttrom M. S. and Paranjpye R. N. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *V. vulnificus*. Microbes and ivfection. 2, 177-188.
- Tison D. L., Nishibuchi M., Greenwood J. D. and Seidler R. J. 1982. *V. vulnificus* biogroup 2: New biogroup pathogenic for eels. Appl. Environ. Microbiol. 44, 640-646.

- shizawa, T., Mori, K. 「Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish.」 1995. *J. Gen. Virol.* 76 : 1563-1569.
- Suzuki, S., Hosono, N. and Kusuda, R. 「Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR.」 1997. *J. Mar. Biotechnol.*, 5 : 205-209.