

하동 지역에 서식하는 바지락의 미생물총 분포에 관한 정량 및 정성적 분석

김명석 · 박준호 · 하재이* · 허민도 · 허성희** · 정현도[†]

부경대학교 수산생명의학과, *국립수산진흥원 동해수산연구소, ** 부경대학교 해양학과

바지락 조직과 주변 환경에 있는 세균의 특성과 분포를 여러 배지와 온도 그리고 생화학적 동정 kit 를 사용하여 비교 분석하였다. 장내, 갯벌, 아가미 그리고 외부체액에 있는 미생물의 집락수는 사용한 BHIA, STA 그리고 SNA 배지에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그리고 15°C 배양조건에서의 증식 속도는 25°C와 35°C의 조건에 비해 느린 것으로 나타났으나 총 세균 집락수는 15°C에서의 것이 가장 높게 나타났다. 영양배지에서 자란 세균집락을 무작위적으로 선택배지에 옮기면 조직 시료를 직접 도 말 한 경우에 비해 높은 비율로 집락형성을 하는 것을 보여 주었다. API 20E와 API 20NE를 사용하여 각 장기 또는 외부에 있는 세균의 종류를 동정한 결과 바지락 조직간에는 서로 유사한 종의 분포를 보 이나 주위 환경이 되는 갯벌이나 외부체액에 있는 미생물군의 종류와는 다르게 나타났다. 바지락 주위의 갯벌이나 외부체액의 미생물군은 *Pseudomonas*가 주종을 이루고 있는 조직내의 미생물군에 비해서 훨씬 높은 다양성을 보여 주었다. 이러한 결과는 바지락 조직이 주위 환경중의 세균에 대한 선택적 친화력이 있음을 의미한다고 할 수 있다.

Key words: Natural commensal flora, Generic diversity, Clam (*Ruditapes philippinarum*), Environment, In-testinal tract microflora

실험실의 제한적 조건에서 양식된 해산패류의 각 장기에서 나타나는 미생물과 주변환경과의 연관관계에 대해서는 몇몇 연구가 이루어져 있다. Kelly 등(1969)과 Vasconcelos 등(1969)은 굴, 대합 등을 오염된 해수에 인위적으로 노출시키면 즉시 주위의 미생물을 흡수 농축하여 환경수 보다 훨씬 높은 오염도를 나타내며 이러한 현상은 환경수의 세균학적 오염도에 대한 지표가 될 수 있다고 보고하였다. 그러나 자연환경 속에서 양식된 패류에서도 이와 유사한 결과를 얻을 수 있는지에 대한 연구는 잘 되어 있지 않다. 나아가서는 주위 환경의 미생물군이 패류내부의 미생물군 형성에 미치는 영향 또는 패류의 각 장기별 주요 미생물종과의 연관성 등에 대한 연구는 매우 미미하게 되어 있을 뿐이다. 이에 비하여 바다생물 중 어류에 나타나는 미생물들에 대한 연구는 최근에 들어오면

서 상당히 깊이 있게 이루어져 왔는데 특히 이들 연구들이 중점을 둔 것은 어류의 부패, 질병, 공생하고 있는 생물 그리고 장내 세균 등에 대한 것이 었다(Colwell and Liston, 1960). 이러한 연구에서 자연산 어류의 장내에는 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ colony forming unit(cfu)/g 정도의 세균이 존재하고 있으며 대개는 G(-)균으로 *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lucibacterium* 등이 주 미생물로 되어 있음이 알려져 있다(Yoshimizu, 1976a; Yoshimizu, 1976b). 또 이러한 미생물군의 집락화에 대해서는 어류의 장이 상당히 선택적으로 유리한 환경을 미생물에게 제공하고 있는 것이 알려져 있을 뿐 이고(Ohwada et al., 1980; Nicolas et al., 1992) 해산 동물간, 특히 어류와 패류에서 각기 다르게 나타날 수 있는 미생물 선택성 또는 환경이 생체 내 미생물 집단의 변화에 미치는 영향 등에 대한 비교 연구는 큰 진전을 이루지 못하고 있는데 그것은 바지락, 굴 등과 같은 패류의 장 또는 아가미에 상주하

[†]Corresponding author

고 있는 정상 미생물총에 대한 정보 부족 때문이다. 더구나 미생물총의 비교 조사에는 각기 다른 세균 배양 및 정량 방법이 사용되었지만(Kimio *et al.*, 1988) 이들 각 방법들에 대한 기초적인 비교가 되어 있지 않고 분리된 수많은 미생물의 동정에 대한 어려움 때문에 지역이나 양식장 등의 차이에 의해서 어떠한 미생물 집단의 변화가 나타나는지를 분석하는데 상당히 어려움이 많았다. 그러므로 본 연구에서는 첫째로 패류의 장기별 총 세균수는 배양 조건 및 배지 종류에 따라 어떤 변화를 보이며 그러한 경향은 패류의 외부 환경에 있는 세균 집단에서도 공통으로 나타나는 것인가를 살펴보고 둘째로 보편적으로 사용되고 있는 각 선택배지에 나타나는 세균의 공통적 증식 특성 변화를 분석함으로써 패류의 각 장기에서 나타나는 미생물군의 생리적 특성 비교를 위한 지표로서의 응용 가능성을 살펴봄으로써 셋째로 API 20E와 API 20NE를 사용하여 패류의 조직과 주변 환경에 서식하는 세균들은 구체적으로 어떠한 종이 있는지 알아보고자 한다. 이러한 연구를 산업적으로 가장 많이 양식되고 있는 바지락을 대상으로 하여 실시함으로써 바지락의 생리적 상태 또는 건강도 측정 및 주변 환경의 세균학적 오염 측정 등에 지표 설정을 위한 기초자료를 제공할 수 있게 하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 채취

경남 하동군 대도면의 공동어장에서 평균 무게 (10.1 ± 2.1 g), 각고(2.7 ± 0.3 cm), 각폭(1.7 ± 0.2 cm)인 바지락을 채취한 후 즉시 실험실로 이송하여 실험에 사용하였다. 이때 바지락을 채취한 곳으로부터 반경 1 m 이내, 깊이 5 cm에 있는 갯벌을 함께 채취하여 실험에 사용하였다.

시료의 준비

채취된 바지락을 해수로 가볍게 세척 후 외각을 천천히 열었고 이때 흘러나오는 액체를 외부 체액으로 사용하였다. 바지락 아가미를 분리하여 채취하고 외부의 표면 근육 및 입수공, 출수공을 제거한 후 남아 있는 조직을 바지락의 장내 세균 분리용 시료로 하여 실험하였다.

시료의 조제

외부체액은 그 자체를 원액으로 하여 멸균된 PBS(pH 7.2) 완충용액에 희석하여 사용하였으며 갯벌은 동량의 PBS(pH 7.2)에서 5분간 현탁교반하고 3분간 부유물질을 자연 침전시킨 후에 상등액을 세균 분리용 원액으로 사용하였다. 바지락의 아가미와 장을 포함하고 있는 조직은 4배의 PBS (pH 7.2) 용액에 넣은 후 homogenizer로 완전히 마쇄하여 상등액을 사용하였다.

세균의 배양

세균의 최적 증식조건 분석을 위하여 조제된 시료들을 PBS(pH 7.2)를 사용하여 적당 농도로 희석하고 0.5%의 NaCl을 TSA와 NA에 첨가한 STA 배지, SNA 배지 그리고 BHIA 배지에 각각 0.1 ml 씩을 triplicate로 하여 도말 하였다. 도말된 각각의 배지는 15°C, 25°C, 그리고 35°C의 조건에서 배양하면서 24시간 마다 나타나는 세균 집락의 수를 조사하였다. 또, TCBS, MacConkey, SS의 3종류의 선택배지에도 0.1 ml씩 도말하여 25°C에서 배양하면서 나타나는 집락의 숫자를 조사하였다.

세균의 평판배지 이동

각각의 시료들을 25°C에서 4일간 BHIA 배지에서 배양 후 나타난 세균 집락 중 명확히 분리되어 나타난 집락을 무작위로 BHIA, TCBS, SS, MacConkey 평판배지로 멸균된 이쑤시게를 사용하여 이동시킨 후 25°C에서 배양하였다. 이때 각각의 평판배지 밑에는 숫자 구획표를 붙여 하나의 집락이 4개의 평판배지에서 각기 동일한 숫자 구획에 있게 하여 각각의 집락이 어떤 선택배지에서 증식을 보이는지 구별할 수 있게 하였다.

세균의 동정

API 20E kit와 API 20NE kit를 각각의 시료에서 평균적으로 35집락씩 취하여 총 136개의 세균집락에 대하여 사용하였다. 이때 BHIA 평판배지에서만 증식을 보이는 집락에 대해서는 API 20NE kit를 사용하였고 BHIA와 어느 한 종류의 선택배지에서라도 증식을 보이는 균주는 API 20E kit를 사용하였다. Kit 사용의 결과는 1만 균주 이상이 수록되어 비교 검색할 수 있는 ATCC의 identific-

ation program을 사용하여 identification possibility로서 80% 이상의 것들만을 취하여 동정균으로 하였다.

결 과

배지종류 및 배양온도가 바지락 장기의 총 세균수 측정에 미치는 영향

총 세균수 측정을 위하여 가장 보편적으로 사용되고 있는 BHIA, STA 그리고 SNA 3종류의 배지를 사용하였으며 배양온도는 15°C, 25°C 그리고 35°C로 하여 각 바지락 장기내의 총 세균수가 사용 배지 및 배양온도에 따라 어떠한 변화를 나타내는지를 분석하였다. 배지가 여러 배양온도에서 각 조직의 세균수 측정에 미치는 영향을 보면 STA 배지 사용은(Fig. 1) 15°C 배양온도에서 갯벌과 아가미조직에서 나타나는 총 세균수가 BHIA(Fig. 2) 및 SNA(Fig. 3)에 비해서 약 70%에 그쳤으며 특히 외부체액 내의 총 세균수는 10%에 그쳐 동온도에서 총 세균수를 측정하는데 최적화된

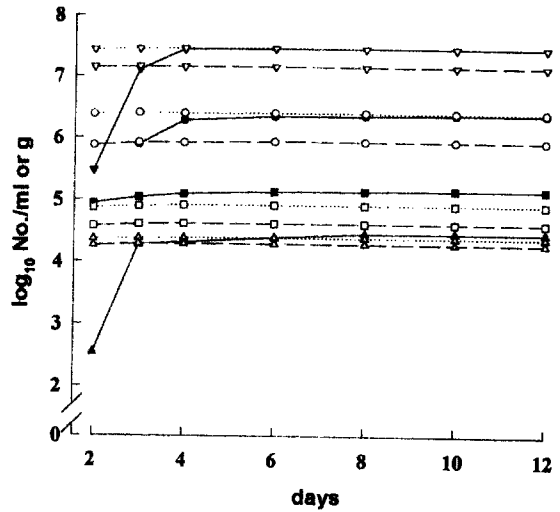


Fig. 2. Total count of bacteria cultured in BHIA plate at different temperatures. (●-●) cfu/g in gill cultured at 15°C, (○-○) at 25°C and (○--○) at 35°C. (▼-▼) cfu/g in intestinal tract cultured at 15°C, (▽-▽) at 25°C and (▽--▽) at 35°C. (▲-▲) cfu/ml in mantle fluid cultured at 15°C, (△-△) at 25°C and (△--△) at 35°C. (■-■) cfu/g in mud cultured at 15°C, (□-□) at 25°C and (□--□) at 35°C.

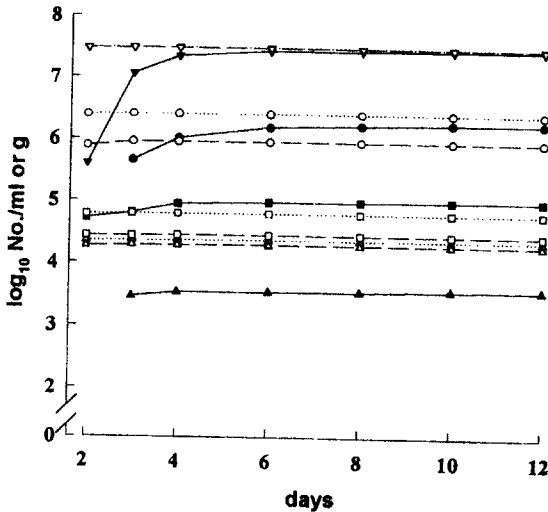


Fig. 1. Total count of bacteria cultured in ST plate at different temperatures. (●-●) cfu/g in gill cultured at 15°C, (○-○) at 25°C and (○--○) at 35°C. (▼-▼) cfu/g in intestinal tract cultured at 15°C, (▽-▽) at 25°C and (▽--▽) at 35°C. (▲-▲) cfu/ml in mantle fluid cultured at 15°C, (△-△) at 25°C and (△--△) at 35°C. (■-■) cfu/g in mud cultured at 15°C, (□-□) at 25°C and (□--□) at 35°C.

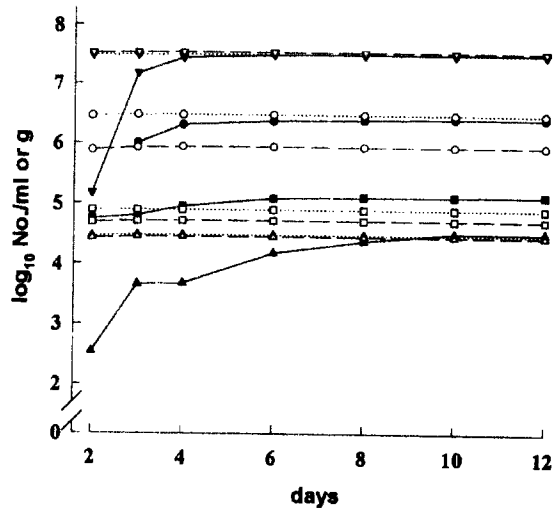


Fig. 3. Total count of bacteria cultured in SNA plate at different temperatures. (●-●) cfu/g in gill cultured at 15°C, (○-○) at 25°C and (○--○) at 35°C. (▼-▼) cfu/g in intestinal tract cultured at 15°C, (▽-▽) at 25°C and (▽--▽) at 35°C. (▲-▲) cfu/ml in mantle fluid cultured at 15°C, (△-△) at 25°C and (△--△) at 35°C. (■-■) cfu/g in mud cultured at 15°C, (□-□) at 25°C and (□--□) at 35°C.

배지로 나타나지 않았고 25°C와 35°C의 배양온도에서는 그 차이가 명확하지 않았다. 그리고 25°C의 배양온도에서 나타나는 바지락 조직내의 총 세균수는 3종류 배지 모두에서 유사성을 띠고 있었고 35°C에서는 SNA 배지에서 증가한 숫자가 나타났으나 그 차이는 크지 않았다.

배양온도가 총 세균수 측정에 미치는 영향을 보면 15°C 배양조건에서는 초기 증식이 각 배지 모두 대단히 늦어 4-6일 배양하여야 최고치의 일정한 세균 숫자에 도달하였으나 25°C와 35°C 배양조건에서는 2일간의 배양시간만으로도 최고치에 도달하는 경향을 보였다. 다만 갯벌내의 세균은 15°C 조건에서도 상당히 빠른 증식을 보여 2일 후에는 나타날 총 세균수의 60% 이상을 관찰할 수 있었으며 총 세균의 숫자도 15°C 배양조건에서 3종류 배지 모두에서 25°C 또 35°C 배양조건에 비해 높은 수치를 나타내었다. 그러나 아가미와 장내세균에서는 15°C, 25°C 그리고 35°C 배양조건에서 배지종류에 따른 총 세균수에서는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 35°C 배양온도에서는 사용배지에 관계없이 다른 배양온도에 대비하여 각각 최소치를 나타내었다. 외부체액은 STA 배지 사용시 총 세균수의 감소 현상이 나타났으나 BHIA와 SNA 배지에서는 유사한 총 세균 숫자가 나타남을 관찰할 수 있었다.

선택배지에서의 장기별 세균의 증식 특성 비교

선택배지에 직접 시료를 도말하여 증식을 나타내는 집락의 수를 BHIA 배지에서 나타나는 총 세균수에 대비한 비율을 조사하였으며 동시에 BHIA 배지의 25°C 조건에서 4일간 배양하여 나타난 세균 집락 중 50개를 무작위적으로 선택하여 TCBS, SS, 그리고 MacConkey 배지에 동시에 접종하여 집락 형성 여부를 각 세균에 대하여 분석하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 직접 도말한 경우에 비하여 replica하였을 경우 TCBS 배지에서는 월등히 높은 비율의 세균이 증식을 보였다. 즉, 바지락 장내와 아가미에 상존하는 세균의 경우 직접도말 하면 BHIA 배지에서 나타나는 세균수의 약 10% 내외가 TCBS배지에서 집락 형성을 보이거나 replica를 시키면 각기 62%와 42%의 집락 형성 비율을 보였고 갯벌과 외부체액의 경우에도 67.5%

Table 1. Comparison between direct smearing from sample and replica from BHIA plate for the formation of colony on three different selective media

Selective media	Tissues	Direct smearing* ¹	replica* ² (%)
TCBS	Intestinal tract	8.4	62.5 (0* ³)
TCBS	Gill	12.7	42.0 (0)
TCBS	Mud	7.2	67.5(2.5)
TCBS	Fluid	6.9	22.5(15)
SS	Intestinal tract	69.7	92.5(0)
SS	Gill	96.1	95.0(0)
SS	Mud	22.9	5.0(0)
SS	Fluid	11.7	27.5(2.5)
MacConkey	Intestinal tract	87.9	92.5(0)
MacConkey	Gill	94.5	95.0(5)
MacConkey	Mud	31.3	15.0(0)
MacConkey	Fluid	18.2	35.0(5)

$$*1 \frac{\text{cfu on selective media}}{\text{cfu on BHIA plate}} \times 100(\%)$$

$$*2 \frac{\left(\frac{\text{numbers of colony appeared on one designated specific and other selective media}}{\text{total numbers of colonies replicated from BHIA plate on selective media}} \right) \times 100(\%)$$

$$*3 \frac{\left(\frac{\text{numbers of colony appeared on one specific and not on two other selective media}}{\text{total numbers of colonies replicated from BHIA plate on selective media}} \right) \times 100 (\%)$$

와 22.5%의 높은 집락 형성 비율을 보였다. 그러나 SS 배지와 MacConkey 배지에 대해서는 바지락 장내균과 아가미 균을 직접도말하여도 70-90%의 높은 집락형성비율을 보여 replica법과의 뚜렷한 차이를 나타나게 하지 않았으며 외부체액의 경우에는 TCBS 배지의 경우와 유사하게 replica법이 높은 비율을 보였다. 그러나 갯벌의 경우에는 오히려 replica법이 직접도말법에 비해 각 선택배지에서 낮은 비율로 집락을 형성하였다.

분리균의 동정과 분포 비율 분석

분리균의 동정을 위해서 API 20E와 API 20NE kit를 사용하였다. BHIA 배지에서 4일간 배양 후 무작위적으로 균의 이동법에 의해 TCBS, SS, 그리고 MacConkey의 3종류 선택배지에 replica하였을 때 어느 한 종류의 선택배지에서라도 증식을 보이는 균은 담즙염에 저항성을 보이는 장내세균으로 추정되어 지므로 API 20E kit를 사용하였으

Table 2. Generic diversity of bacteria within the examined organs and mud

Bacterial groups	Intestinal tract (%)	Gill (%)	Mantle fluid (%)	Mud (%)
<i>Pseudomonas</i>	75.2*	73.8	12.5	17.6
<i>Chryseomonas</i>	9.1	21.9	6.3	20.5
<i>Flavobacterium</i>	4.5	-	6.3	6.9
<i>Erwinia</i>	-	-	12.5	6.9
<i>Vibrio</i>	-	-	9.4	6.9
<i>Pasteurella</i>	-	-	15.4	3.4
<i>Aeromonas</i>	-	-	6.3	6.9
<i>Sphingomonas</i>	-	-	9.4	-
<i>Acinetobacter</i>	-	-	6.3	-
<i>Xanthomonas</i>	-	-	3.1	17.2
<i>Enterobacter</i>	4.5	-	-	3.4
<i>Weeksella</i>	-	-	-	3.4
unidentified	6.7	4.3	12.5	6.9

*From a total of 136 analyzed colonies, 83 and 53 colonies were identified by API 20E and API 20NE kit, respectively.

며 공시한 선택배지에서도 증식을 보이지 않고 BHIA 배지에서만 증식을 보이는 균은 API 20NE kit를 사용하여 동정하였다. 분석된 총 분리균은 136균주 이었으며 그밖 염색에서 (+)로 나타난 균은 총 세균의 5% 이하로 나타났으므로 이에 대한 동정은 실시하지 않았다. Table 2에서 보여 주듯이 장과 아가미에서는 *Pseudomonas*가 우점종이었고 황색 색소 생성균인 *Chryseomonas*와 *Flavobacterium*도 분포하고 있었다. 그러나 채액과 주변 연의 진흙 내에는 다양한 종류의 세균이 존재하고 있으며 각 세균의 분포 비율도 비슷한 상태를 보이고 있음을 확인하였다. 따라서 외부채액 또는 주변 갯벌에 있는 세균종류와 바지락의 조직 내에 있는 세균 종류는 그 분포에 있어서 차이가 있음을 알 수 있었다.

고 찰

해수, 담수, 우유 그리고 여러 음식 중에 있는 총 세균수를 헤아리기 위하여 MPN(Most Probable Number)법이 보편적으로 많이 이용되고 있으나 (Colwell, 1980) 이는 coliform의 세균수를 헤아리는데 보다 적합하게 되어 있어 진정한 총 세균수를 산출해 내기 위해서는 평판배지법을 사용하여

야 할 것이다. 그런데 평판배지법을 해산생물 또는 해수에 적용하기 위해서는 이 방법에 대한 보다 정밀한 고찰이 있어야 할 것이나 일반적으로 TSA에서 25°C, 48시간 배양이라는 전통 방법을 여과 없이 그대로 받아들여지고 있다. 그러나 이는 해수, 갯벌, 장내세균 등과 같이 다양한 세균의 종류가 혼합되어 있는 경우에는 그 배양 조건이나 배지를 시료의 종류에 따라 최적화를 분석한 뒤 보다 적절히 변화시켜 적용한다면 더욱 명확한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

본 실험에서 배양온도를 25°C 이상으로 하면 바지락 조직 시료의 종류에 무관하게 배양기간이 48시간에서 최고치에 도달하나 15°C에서는 6일 이상이 소요되는 것으로 나타나 저온에서의 세균 증식속도가 늦어짐을 알 수 있었다. 그러나 나타난 총 세균수는 15°C와 25°C에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 35°C 조건에서는 매우 감소된 결과를 나타내어 배양온도는 25°C 이하로 하는 것이 보다 정확한 세균수를 산출해 낼 수 있을 것이며 저온에서 ST 배지의 결과를 제외하면 분석에 사용된 3종류의 배지는 온도, 시료의 종류에 따라 총 세균수에 뚜렷한 영향을 미치지 않으므로 특별한 구성성분 첨가 등의 효과는 고려하지 않아도 될 것이다. 흥미 있는 것은 갯벌내의 세균들은 바지락 조직내의 세균에 비해 저온에서 빠른 증식속도를 나타내었는데 그것이 계절적으로 바뀌는 온도의 영향에 따라 변화 할 수 있는 것인지에 대해서는 다시 조사해 보아야 할 것이다.

개요적인 세균의 동정을 위하여 많은 선택배지들이 개발되어 있는데 그 중에서 가장 대표적인 것은 TCBS, MacConkey 그리고 SS 배지일 것이다. 이러한 배지들이 바지락 조직내의 세균 또는 주변 환경에 있는 세균의 개요적 동정에 어느 정도 의미 있는 결과를 도출해 낼 수 있는지에 대한 분석을 하였다. BHIA에서 나타난 세균 집락을 tooth stick을 이용하여 TCBS, MacConkey, SS 배지에 replica하였을 때 바지락 조직내의 세균들 중 각각의 한 종류 선택 배지에서만 증식을 보이는 세균은 5% 이하로 나타났고 대부분은 3종류 선택 배지 모두에서 증식하는 것을 확인하였는데 이것이 BHIA plate상의 집락이 순수 분리된 상태가 아니었기 문인지는 확인되지 않았다(Table 1). 그러

나 여러 선택배지에서 자랄 수 있는 *Pseudomonas*가 주종을 이루는(Table 2) 수산생물내의 세균 분석에는 반드시 cefsulodin(Manafi and Kneifel, 1989)과 같은 *Pseudomonas* 억제 항생제가 첨가된 배지에서의 세균 증식에 대한 결과가 함께 있어야 할 것이다. 또한 바지락 외부체액이나 주변 갯벌 내의 세균 중에도 상당수의 *Pseudomonas*가 존재하므로(Table 2) 단일 선택배지 보다는 몇 종류의 선택배지를 사용하여 각각의 배지에 나타난 세균 집락수를 비교하여 *Pseudomonas* 등과 같이 여러 선택배지에서 증식을 보이는 세균의 비율을 추정해 나가면서 개요적인 세균의 동정을 구하여야 할 것이다.

API 20E와 API 20NE kit를 사용하여 부분적으로 동정된 세균의 종류(Kent, 1982; MacDonell, 1982)는 바지락 조직내의 세균 그룹과 갯벌 또는 외부체액중의 세균 그룹이 서로 다르게 구성되어 있음을 알 수 있다. 이는 Ohwada 등(1980)의 결과와 같이 어류나 바지락 등의 조직은 특정 세균종에 대하여 각기 독특한 선택성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 Horsley 등(1977)이 어류에서 아가미와 장내세균의 종 분포가 동일하지 않다는 결과와는 달리 바지락에서는 매우 유사한 결과를 나타내어 척추동물인 어류와 연체동물인 바지락이라는 종의 특성에 의하여 조직 내에 있는 세균의 분포가 각기 다르게 나타날 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 굴의 larvae에 있는 세균의 65-70%는 *Pseudomonas*였다는 Murchelano 등(1975)의 보고와 일치되게 동일한 연체동물의 한 종인 바지락 내에서의 주된 세균종도 *Pseudomonas*임을 확인할 수 있었다. 이는 무지개 송어의 장내 조직에서 주종을 이루는 세균인 *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacteria*가 각각 20% 정도의 분포를 보인다는 Ninagawa 등(1983), Nieto(1984)의 어류에 대한 분석과는 다른 결과를 보여주었다. 그러나 어류에서 여러 환경적 변화 즉 수온, 스트레스, 염도 등에 의하여 어류 장기내의 세균총이 변화한다는 보고(Liston, 1957; Yoshimizu, 1976a; Ohwada et al., 1980; Sakada et al., 1980)와 같이 바지락내의 세균 분포도 주위의 오염도, 기온, 갯벌의 영양 상태, 염도 등에 의하여 변화할 수 있으므로 이러한 영향에 대한 깊이 있는 연구가 계속적으로 이루어져

야 할 것이다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구(981-0614-074-1)지원으로 수행되었으며, 본연구를 위하여 협조해 주신 하동어민 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

- Colwell, R. R.: Enumeration of specific populations by the Most-Probable-Number (MPN) method. American Society for Testing and Materials, 56-61, 1980.
- Colwell, R. R. and Liston, J.: Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Appl. Microbiol., 8: 104-109, 1960.
- Horsley, R. W.: A review of bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for analysis. J. Fish Biol., 10: 529-554, 1977.
- Kelly, C. B., Arcisz, W., Persnell, M. W. and Harris, E. K.: Bacterial accumulation by the oyster, *Crassostrea virginica*, on the Gulf coast. R. A. Taft Sanit. Eng. Center Tech. Rep. F60-4, 45p, 1960.
- Kent, M. L.: Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* specific pathogenic to fishes using API 20E. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39(12), 1725-1729, 1982.
- Kimio, O., Ohara, S. and Ishida, Y.: A modified MPN method for counting oligotrophic bacteria by using naturally occurring organics. Nippon Suisan Gakkaishi., 54(9): 1659-1663, 1988.
- Liston, J.: The Occurrence and distribution of bacterial types on flatfish. J. Gen. Microbiol., 16: 205-216, 1957.
- MacDonell, M. T., Singleton, F. L. and Hood, M. A.: Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 44: 423-427, 1982.
- Manafi, M. and Kneifel, W.: A combined chromogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water. Zentrabl. Hyg., 189: 225-234, 1989.
- Murchelano, R. A.: Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from sea water used in the laboratory culture of the American oyster, *Crassostrea virginica*. J. Fish. Res. Board Can., 32(6): 739-745, 1975.
- Nicolas, J. L., Anspuer, D. and Cochard, J. C.: Iso-

- lation and characterization of a pathogenic bacterium specific to Manila clam *Tapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 14: 153-159, 1992.
- Ninagawa, T., Toshihiro, N. and Muroga K.: *Edwardsiella tarda* in eel culture environment. *Fish Pathol.*, 17: 243-250, 1983.
- Ohwada, K., Tabor, P. S. and Colwell, R. R.: Species composition and barotolerance of gut microflora of deep-sea benthic macrofauna collected at various depths in the Atlantic ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40(4): 746-755, 1980.
- Sakata, T., Okabayashi, J. and Kakimoto, D.: Variation in the intestinal microflora of tilapia reared in fresh and sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46: 967-975, 1980.
- Nieto, T. P., Alicia E. Toranzo and Juan L. Barja: Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north-west of Spain. *Aquaculture*, 42: 193-206, 1984.
- Vasconcelos, G. T., Jakubowski, W. and Ericksen, T. H.: Bacteriological changes in shellfish maintained in an estuarine environment. *Proc. Natl. Shellfish. Ass.*, 59: 67-83, 1969.
- Yoshimizu, M. and Kimura, T.: Study on the intestinal microflora of Salmonids. *Fish Pathol.*, 10: 243-259, 1976a.
- Yoshimizu, M., Kimura, T. and Sakai, M.: Studies on the intestinal microflora of salmonids. I. The intestinal microflora of fish reared in fresh water and sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 42: 91-99, 1976b.

Quantitative and Qualitative Studies of Commensal Bacterial Flora of Clam, *Ruditapes philippinarum* in Hadong Area

Myoung Sug Kim, Jun-Hyu Park, Jae Yi Ha* Min-Do Huh,
Sung-Hoi Huh** and Hyun Do Jeong

*Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries of Sciences,
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

**East Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Agency,
Kangleung 210-800, Korea*

***Department of Oceanography, College of Marine Science and Technology,
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

Characteristics and distribution of the natural commensal flora in the surrounding environment and tissues of clam in Hadong area were studied under varying conditions of growth media and incubation temperatures. Total numbers of bacteria present in intestinal tract, gill, body fluid and surrounding mud were found to be not influenced by the used BHIA, STA and SNA media. Although the growth rate of bacteria at the condition of 15°C incubation temperature was slower than that of 25°C and 35°C, it showed the highest number of total bacteria compared with other two different conditions of incubation temperature. Interestingly, the proportion of bacteria able to form colony on several selective media was higher in replica analysis from nutrient media to selective media than that in direct smearing from samples. The generic diversity of bacteria isolated from the tissues and analyzed by API 20E and API 20NE kit showed similar pattern with each other and distinct from that of environment. The distribution of bacteria in the surrounding mud or mantle fluid of clam indicated a high diversity comparable to that found for the gill or intestinal tract microflora, with *Pseudomonas* being the prevalent group. It implies that the tissues of clam may provide a selective habitat for a commensal microflora.

Key words: Natural commensal flora, Generic diversity, Clam (*Ruditapes philippinarum*), Environment, Intestinal tract microflora