

해양에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus* Phage의 특성

부산대학교 자연과학대학 미생물학과¹, 대학원 미생물학과,
제주대학교 해양과학대학 해양생산과학부²,
울산대학교 자연과학대학 생명과학부³

윤선옥 · 주성아³ · 허문수² · 정초록 · 주진우¹

=Abstract=

Characterization of a *Vibrio parahaemolyticus* Phage Isolated from Marine

Sun-ok Yoon, Seong-A Ju³, Moon-Soo Heo², Cho-Rok Jung and Jin-Woo Ju¹

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan, Korea¹

Department of Microbiology, Graduate School, Pusan National University, Pusan, Korea

Faculty of Applied Marine Sciences, College of Ocean Sciences, Cheju National University²

Division of Biological Sciences, College of Natural Science, Ulsan University³

A novel bacteriophage, designated as VPP97, that infects the strains of *Vibrio parahaemolyticus* (halophilic, Gram-negative bacterium) isolated most commonly from marine environments, has been discovered, and several of its properties have been determined. The plaques were clear and sized 0.6~1.0 mm in diameter. The virion forms a single band on 70% sucrose gradient and p1.50 CsCl gradient by sucrose gradient centrifugation and CsCl gradient centrifugation respectively. It has a hexagonal head and a relatively long tail, as shown by electron microscopy. *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* were also sensitive to this phage. It was almost totally inactivated at 70°C and at pH below 5 or over 10. The nucleic acid of VPP97 is composed of DNA. The VPP97 had 9 specific structural proteins sized between 21.5 kDa and 97.4 kDa on SDS-PAGE. When *V. parahaemolyticus* cultures were treated with either phage VPP97 or one of the several antibiotics for 2 hours, the viable number of *V. parahaemolyticus* treated with the phage VPP97 is lower than that treated with chloramphenicol, erythromycin or penicillin, but not lower than that treated with tetracycline. Mice that have responded to the phage treatment revealed the lower numbers of *V. parahaemolyticus* in small intestine and less damage on small intestine compared to the untreated mice. Therefore, we suggest that the phage treatment appears effective to the infection by *V. parahaemolyticus*.

Key Words: *Vibrio parahaemolyticus* phages, Characterization of phages, Phage therapy

서 론

전 세계 해수, 해산물에 분포하고 있는 미생물

인 *Vibrio parahaemolyticus* (이하 장염 비브리오)는 여름철 해수에서 빈번히 발견되는 인체 병원성균이다. 해산물을 생식하였을 때 심한 설사, 복통, 구토를 일으킨다³⁰). Bacteriophage (이하 파아

접수 : 1999년 7월 16일, 게재결정 : 1999년 10월 18일

* Corresponding author: 주진우, 부산시 금정구 장전동 부산대학교 자연과학대학 미생물학과

지)는 1915년 Twort의 연구를 시초로 하여 1917년 d'Herelle가 콜레라환자의 분변실험에서 "lytic principle"을 발견한 이후로 각종 파아지에 대한 연구가 계속 진행되어 왔다¹¹⁾. 자연환경에는 각종 세균에 대한 파아지들이 분포하고 있는데, 특히 해양에 분포하는 해양성 파아지는 해안에 서식하는 *Vibrio*속을 비롯한 각종 해양 미생물이 보고된 후 Smith 등³⁴⁾과 Spencer³⁶⁾에 의해서 연구되기 시작하였다.

비브리오 파아지는 1927년 인도에서 광범위한 cholerae bacteriophage에 대한 연구가 시작되어 13종의 파아지를 검출하였고, 1960년을 기점으로 물리, 화학적 및 생물학적인 비브리오 파아지의 특성 연구가 인도를 중심으로 활발히 진행되었다³⁶⁾. 파아지는 실생활에 있어 그 응용범위가 넓어서 박테리아의 동정과 분류, 질병의 치료, 바이오테크놀로지 도구에 이용되고 있다. 첫째, 세균 동정에서의 파아지의 이용이다. 세균 동정에서의 파아지의 이용은 1925년 Sonneschein³⁵⁾에 의해 도입되었다. 파아지는 처음에 생화학적 혹은 혈청학적인 수준에서 진단시약으로서 이용되었다. *V. cholerae*의 경우, 이의 3가지 biotype을 밝히는데 파아지가 이용되고 있다^{12,28,29,37)}. 이러한 목적을 위하여 예전에는 산양적혈구 용해시험과 polymyxin 감수성시험이 이용되었으나 파아지에 의한 시험도 99% 이상의 정확성을 보이므로 빠른 biotype 동정에 이용되고 있다. 둘째, 파아지의 질병 치료에의 이용이다. 파아지 치료는 1921년 Bruynoghe와 Maisin¹³⁾이 포도구균성 피부질환을 파아지로 치료함으로써 시작되었다. 항생제와 sulfonamide 시대 이전에는 이 치료법이 아주 관심의 대상이었다. 그래서 pyogenic & urinary infection, cholera, dysentery, plague, typhoid, paratyphoid fever 등 여러 질병에 치료법으로 시도되었다^{31,32)}. 그러나 항생제의 등장으로 인하여 파아지의 치료법은 사라지게 되었지만 최근 프랑스와 폴란드에서 파아지를 질병의 치료에 이용하려는 연구가 다시 시작되고 있다. 요즘 항생제 내성인 세균이 증가하고, 원내감염도 증가하기 때문이다. 이러한 파아지의 이용성에 토대를 두고, 저자는 본 연구를 통하여 해양으로부터 *V. parahaemolyticus* 파아지를 분리하고, 이것의 기본적인 특성을 밝힘과 동시에 치료제로서의 이용가능성을 알아보고자 하였다. 결과를 바탕으로 *V. parahaemolyticus* 파아지에 대한 정보를 제공하고, 효과적인 치료제로서의 파아

지의 이용 가능성에 대한 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

부산 다대포, 일광, 송정의 해안에서 97년 4월에서 7월에 걸쳐 채취한 해수, 해산물, 해조류, 모래로부터 분리 동정된 *V. parahaemolyticus*를 사용하였다.

2. 파아지의 분리와 농축 및 정제

경남 남해, 부산 다대포, 자갈치 등에서 채취한 해수, 해산물, 해조류, 모래로부터 주 등의 비브리오 파아지 분리방법에 따라서 파아지를 분리하였다^{4,6,7,8,9,10)}.

채취한 시료를 분쇄기로 파쇄하여 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액에 해양에서 분리한 *V. parahaemolyticus*를 증균배지에서 대수 증식기까지 진탕배양시킨 균액을 동량 혼합하여 37°C, 12~24시간 진탕배양하였다. 이 배양액을 원심분리하여 세포를 침전시킨 후 상등액을 미리 증충법으로 준비해 둔 숙주균 평판 위에 5 µl씩 떨어뜨려서 37°C 하룻밤 배양한 다음 용균 부위를 관찰하여 파아지의 존재유무를 판정하였다. 이렇게 하여 용균 부위가 관찰되면 배양상등액을 Adams의 증충법¹¹⁾으로 숙주균과 반응시켜 플라크 형성을 유도시키고 이 중에서 한 플라크를 선택하여 순수분리하였다. 순수분리된 파아지의 정량은 Adams의 증충법¹¹⁾에 의한 용균반 계수법으로 실시하였다.

파아지의 번식은 Adams의 증충법^{11,17,33)}에 따라 행하였으며, PEG침전법²⁵⁾과 40000 rpm, 2시간 초원심분리하여 파아지를 침전시킨후 농축하는 방법을 병용하였다. 농축시킨 파아지를 정제하는 방법으로는 Yamamoto et al에 의한 CsCl 밀도구배 원심분리법²⁰⁾과 sucrose 밀도구배 원심분리법^{14,15,21,23)}을 이용하였다.

3. 전자현미경에 의한 파아지의 형태관찰^{10,34,36,40)}

200 mesh의 구리 grid에 collodin 지지막을 입히고 진공 증착기로 탄소를 증착한 후 파아지 농축액을 묻혀 2분간 건조시키고 2% uranyl acetate 용액으로 30~60초간 염색을 하고 3회 수세하여 건조시킨 후 전자현미경 80 KV하에서 형태를 관

찰하고 사진촬영을 하였다.

4. 파아지의 숙주역 시험

대수 증식기까지 키운 비브리오 종 (*Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*)과 해양에서 분리한 *V. parahaemolyticus*를 증충법으로 접종한 평판배지위에 10^6 PFU/ml의 파아지액을 5 μ l 씩 떨어뜨려서 37 $^{\circ}$ C 하룻밤 배양하여 용균 부위를 관찰함으로써 판정하였다^{4,6,7,8,9,10}.

5. 파아지의 안정성 시험

1) 온도 안정성

0.9 ml의 파아지 완충액을 5 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C에서 각각 항온시킨 후, 10^9 PFU/ml 파아지액을 0.1 ml씩 첨가하여 10분 동안 더 항온시켜 각 온도에서의 생존 파아지수를 정량하였다. 이때 40 $^{\circ}$ C에서의 파아지 생존을 100%로 하였다^{4,6,7,8,9}.

2) pH 안정성

pH 3~pH 11로 조정된 파아지 완충액 0.9 ml에 10^9 PFU/ml 파아지액을 0.1 ml 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 반응시킨 후에 각 pH에서의 생존 파아지수를 정량하였다. 이때 pH 8에서의 파아지 생존을 100%로 하였다^{4,6,7,8,9}.

6. 파아지 핵산의 분리 및 확인

농축 정제한 파아지액에 buffered phenol을 동량 넣은 후 원심분리 (12000 rpm, 10 min)하여 수층만을 취하였다. 이후 phenol과 chloroform (1:1) 용액과 chloroform사용하여 핵산을 추출하여 100% 에탄올로 침전시킨 후, 70% 에탄올로 세척하고 진공회전농축기에서 10분간 건조한 후, 3차 증류수로 현탁하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 분리한 파아지 핵산을 ethidium bromide 5 μ l/ml가 첨가된 0.5% agarose gel에서 10 V/cm의 전압으로 전기영동하여 UV-transilluminator (302 nm)에서 관찰하였다. 또 분리된 핵산이 DNA인지 RNA인지를 확인하기 위하여 각각 DNase 100 μ l/ml, RNase 100 μ l/ml로 37 $^{\circ}$ C, 2시간 처리한 핵산을 효소처리 이전의 핵산과 함께 ethidium bromide 5 μ l/ml가 첨가된 0.5% agarose gel에 전기영동시킨 후 UV하에서 관찰하였다.

7. 파아지 구조 단백질의 분석

파아지 구조단백질 분석은 Laemmli의 방법²⁴)에 의하여 실시하였다. 농축 정제된 파아지액 17 μ l에 5배 농축의 loading buffer를 넣은 후 100 $^{\circ}$ C에서 2~3분 가열하고 5%의 stacking gel과 15% separating gel을 만들어 160V로 SDS-PAGE하였다. 그리고 Coomassie blue법으로 6시간 염색한후 10% acetate와 15% methanol을 섞은 탈색액으로 탈색시켜 밴드를 확인하였다.

8. 파아지와 항생제의 균저해 비교시험

파아지가 감수성이 있는 여러 항생제에 비교하여 균저해에 대해 효과가 있는지를 알아보기 위해 실시하였다. 먼저 2%의 NaCl이 든 BHI액체배지에 chloramphenicol (30 μ g), erythromycin (15 μ g), tetracycline (30 μ g), penicillin (10 units), phage VPP 97 (3×10^8 PFU/ml)를 각각 첨가하고, 본 배양하여 washing하여 든 숙주균 3×10^8 CFU/ml을 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 진탕 배양하면서 2시간 경과후의 생균수를 측정하였다. 이때, 대조군으로는 숙주균만 접종한 것을 이용하였다¹⁹).

9. 파아지의 치료 효과

파아지를 약제로 이용했을 때의 치료 효과를 관찰하기 위하여 장내 숙주균 생균수의 변화, 장의 조직변화 등을 검토하였다.

1) 장내 숙주균의 생균수 변화¹⁹

먼저 3개의 군 (파아지 처리구, 파아지 비처리구, 대조구)으로 나눈 다음 각 군은 마우스 3마리씩으로 하여 수치는 평균적으로 나타내었다. 37 $^{\circ}$ C에서 본배양한 숙주균 2×10^8 CFU/ml를 파아지 처리구와 파아지 비처리구 마우스의 복강에 주사하였다. 이때, 대조구는 균 대신 식염수를 주사하였다. 그리고 1시간 후, 파아지 처리구에는 파아지를 2×10^8 PFU/ml씩 복강으로 주사하고, 파아지 비처리구와 대조구는 그대로 두었다. 그 후, 3시간 있다가 마우스의 복부를 절개하여 소장을 취한다음, 같은 부위를 1 cm씩 절단하여 10개 절단 부위를 준비해 둔 10 ml의 식염수가 든 시험관에서 충분히 파쇄하여 10배 씩 serial dilution하여 숙주균 생균수를 측정하였다.

2) 장조직의 변화

먼저 3개의 군 (파아지 처리구, 파아지 비처리구, 대조구)으로 나눈 다음 각 군은 마우스 3마리



Figure 1. Plaques of *V. parahaemolyticus* phage VPP97.

씩으로 하여 수치는 평균적으로 나타내었다. 37℃에서 본배양한 숙주균 2×10⁸ CFU/ml를 마우스의 복강에 주사하였다. 그리고 1시간 후, 파아지 처리구에는 파아지를 2×10⁸ PFU/ml씩 복강으로 주사하고, 파아지 비처리구는 그대로 두었다. 그후, 3시간 있다가 마우스의 복개를 절개하여 소장을 취한 다음, 이것을 10% 중성 포르말린으로 24시간 동안 고정하고, 알코올과 자일렌으로 단계별로 탈수처리하여 파라프라스트로 포매시킨 후 파라핀 블록화하였다. 이후 microtome을 사용하여 5 μm의 크기로 박절한 후 hematoxylin-eosin (이하 H-E염색)을 실시하여 위상차 현미경으로 조직의 변화유무를 관찰하였다.

결 과

1. 파아지의 분리와 명명

이전에 분리한 *V. parahaemolyticus*를 사용하여 해산물 등의 가검물을 가지고 시험한 결과 1주의 파아지가 분리되었으며, 분리된 *V. parahaemolyticus* 파아지를 VPP97이라고 명명하였다. 이들은 중층 평판배지에서 직경 0.6~1.0 mm의 투명한 용균반을 형성하였다 (Fig. 1).

2. 파아지의 정제

VPP97은 CsCl 밀도구배 원심분리의 경우 ρ 1.50 상층에 밴드를 형성하였으며, 이를 회수하여 파아지완충액으로 투석하였다. sucrose 밀도구배 원심분리의 경우 70% 상층에 밴드를 형성하였으며, 이를 회수하여 파아지완충액으로 세척하였다.

Table 1. Host range of *Vibrio* species

Host strain	VPP97
<i>V. anguillarum</i>	- ^{a)}
<i>V. alginolyticus</i>	+ ^{b)}
<i>V. fluvialis</i>	+
<i>V. furnissii</i>	+
<i>V. mimicus</i>	-
<i>V. vulnificus</i>	-
<i>V. parahaemolyticus</i> isolate	+

a): No lysis of strain, b): Lysis of strain

3. 파아지의 전자현미경적 형태

순수분리한 VPP97을 농축하여 음성염색으로 그 형태를 관찰하였다 (Fig. 2). VPP97은 세로 60 nm, 가로 34 nm의 직육각형 두부와 수축성 미부를 가진 파아지였다. 이러한 형태로 볼때, VPP97은 국제바이러스분류위원회와 Ackermann의 분류에 의하면 Myoviridae과에 속하는 것으로 추정된다.

4. 파아지의 숙주역 시험

분리한 파아지를 비브리오속 6균주와 해양에서 분리한 *V. parahaemolyticus*에 대하여 숙주역 시험을 한 결과는 Table 1과 같다. 파아지 VPP97은 *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*에 감수성을 가지며, 분리한 *V. parahaemolyticus*에 대해서도 감수성을 가졌다.

5. 파아지의 안정성시험

1) 온도 안정성

10~70℃에서 10분간 열처리하였을 때 VPP97의 온도 안정성은 Fig. 3과 같았다. VPP97은 40℃까지는 안정하였으나 40℃ 이상에서는 점차 감수성이 증가하여 70℃에서는 거의 모든 파아지가 불활성화되었다.

2) pH 안정성

VPP97의 pH 안정성은 Fig. 4와 같았다. VPP97은 산성과 알칼리성 pH에서도 비교적 안정한 파아지로서 pH5~pH10사이에서는 80% 이상의 안정성을 나타내었다.

6. 파아지 핵산의 특성

VPP97의 핵산을 앞의 방법으로 분리한 뒤

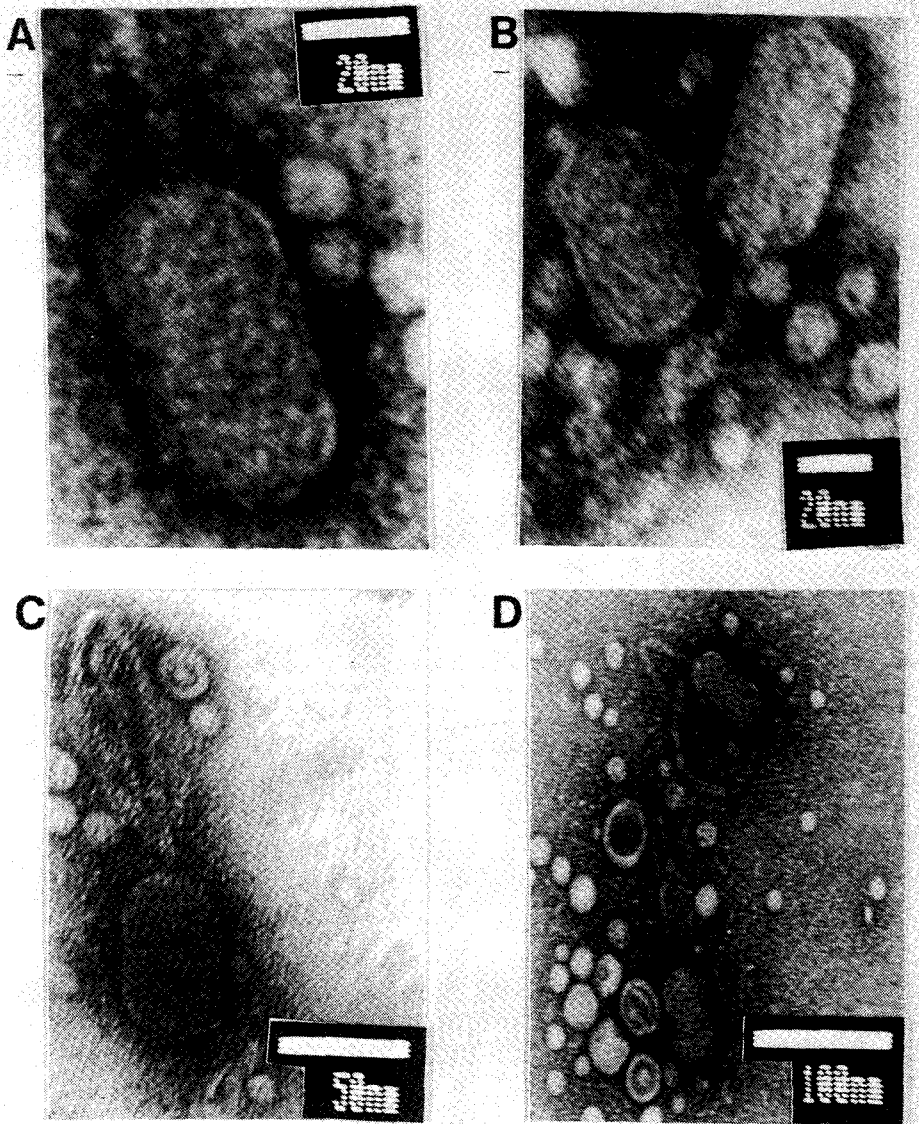


Figure 2. Electron micrographs of *V. parahaemolyticus* phage VPP97. A) ($\times 300$ K), B) ($\times 200$ K), C) ($\times 150$ K), D) ($\times 75$ K).

λ DNA/Hind III를 size marker로 하여 전기영동한 결과 분자량 사이즈 마커 23 Kb 위쪽에 위치하는 하나의 밴드를 관찰할 수 있었다. DNase와 RNase 처리 후 전기영동한 결과, DNase를 처리한 경우에는 VPP97 핵산이 효소에 의해 분해되어 밴드를 확인할 수 없었고, RNase를 처리했을 때는 효소 처리 이전의 핵산과 같은 위치에서 밴드를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 따라서 이 파이지 VPP97은 DNA를 가지고 있음을 알수 있었다.

7. 파이지 구조 단백질의 분석

VPP97의 구조 단백질을 알아보기 위하여 SDS-PAGE하여 Coomassie blue 염색한 결과는 Fig. 6과 같다. 파이지 VPP97은 21.5 kDa와 97.4 kDa 사이에 9종류의 단백질을 가지고 있으며, 각 단백질의 양은 다소 차이가 있었다.

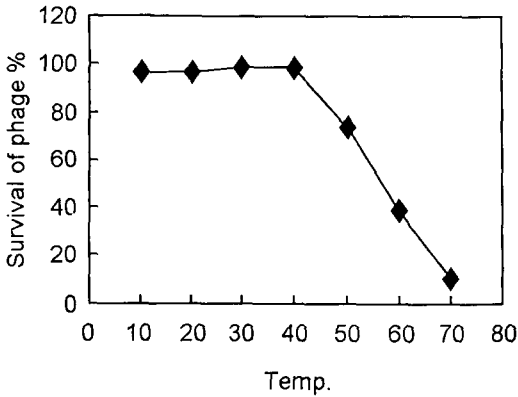


Figure 3. Thermostability of *V. parahaemolyticus* phage VPP97.

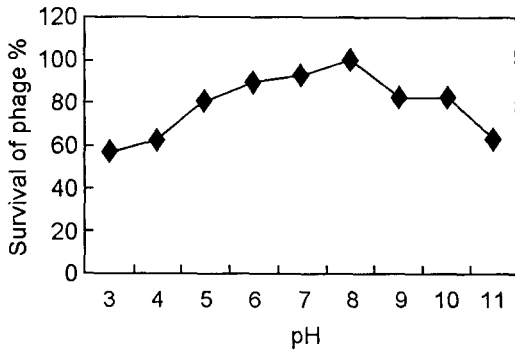


Figure 4. pH stability of *V. parahaemolyticus* phage VPP97.



Figure 5. Agarose gel electrophoresis of VPP97 DNA.

Lane A: Lamda DNA digested with Hind III (1: 23.13, 2: 9.42, 3: 6.56, 4: 4.36, 5: 2.32, 6: 2.0 (kb)), Lane B: VPP97 whole DNA, Lane C: VPP97 DNA digested with RNase, Lane D: VPP97 DNA digested with DNase.

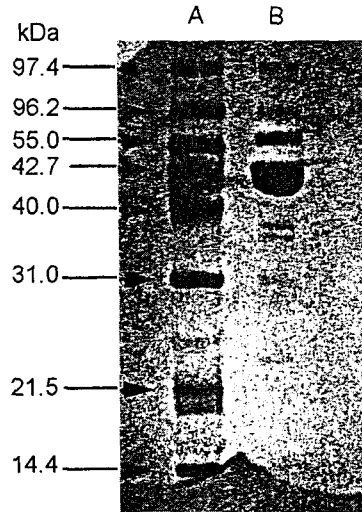


Figure 6. SDS - PAGE of coat proteins of *V. parahaemolyticus* phage VPP97, A) Marker proteins, B) VPP97.

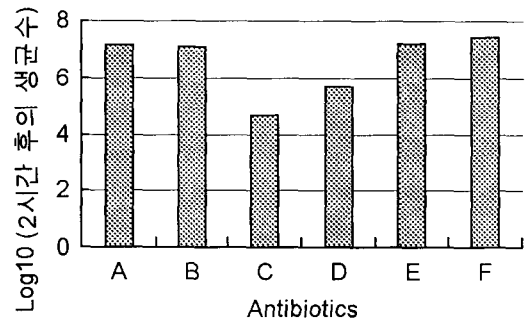


Figure 7. Effects of phage VPP97 and various antibiotics on the viability of the host strain. A: Chloramphenicol, B: Erythromycin, C: Tetracycline, D: Phage VPP97, E: Penicillin, F: Control.

8. 파아지와 항생제의 균저해 비교시험

숙주에 각각의 항생제를 처리하고 나서 2시간 후의 평균수의 분포는 다음과 같다 (Fig. 7). *V. parahaemolyticus*에 감수성이 있는 chloramphenicol, erythromycin, tetracycline의 경우 tetracycline의 효과가 가장 뛰어나고 다른 두 항생제의 경우는 효과가 거의 없었다. 내성이 있는 penicillin의 경우도 마찬가지로 거의 효과가 없었다. 위의 감수성이 있는 항생제와 파아지 VPP97을 비교했을 때에는 파아지 VPP97은 tetracycline보다는 효과가 조금 떨

Table 2. Effect of phage on infection of mouse small intestine by *V. parahaemolyticus*

	Control (Saline)	VPP97* + <i>V. parahaemolyticus</i>	Injection only <i>V. parahaemolyticus</i>
No. of mice	3 ^a /3 ^b	3/3	2/3
No. of bacterial colony	$(1.87 \times 10^7) \pm 5$ CFU/ml	$(1.64 \times 10^7) \pm 5$ CFU/ml	$(2.1 \times 10^8) \pm 5$ CFU/ml

*: *V. parahaemolyticus* phage, a: No. of mice survived, b: Total No. of mice tested

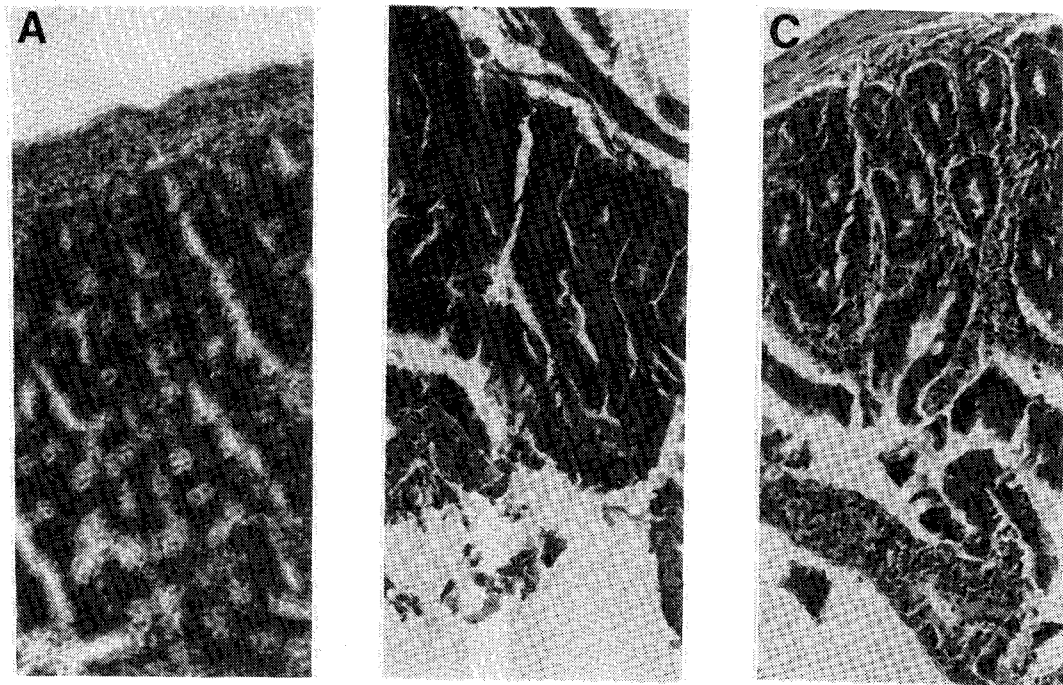


Figure 8. Histological changes in mouse small intestines treated with or without phage VPP97 ($\times 400$). Hematoxylin-Eosine stained, A) Control, B) Host, C) Host + phage VPP97.

어지지만 다른 항생제보다는 월등히 좋은 효과를 보였다.

9. 파아지의 치료 효과

1) 장내 숙주균 생균수의 변화

VPP97 처리 2시간 후 VPP97 처리구와 VPP97 비처리구를 비교하였을 때, VPP97 비처리구는 3마리의 마우스중 1마리는 죽고 2마리가 살아 있었으며, VPP97 처리구는 3마리 모두 살아 있었다. 그리고 이들 장을 일정부분 채취하여 숙주균의 생균수를 측정하였을 때, VPP97 비처리구는 생균수가 2.1×10^8 CFU/ml이었고 VPP97 처리구는 생

균수가 1.64×10^7 CFU/ml였다 (Table 2).

2) 장조직의 변화

조직 처리한 후 현미경으로 실험조직을 관찰한 결과 소장용모의 괴사는 모두 일어났으나 숙주인 *V. parahaemolyticus*만 감염시킨 것보다 숙주와 VPP97을 같이 감염시킨 것이 손상을 덜 입었음을 보여준다 (Fig. 8).

고 찰

파아지는 1915년 Twort의 연구를 시초로 하여 1917년 d'Herelle가 콜레라환자의 분변실험에서

"lytic principle"을 발견한 이후로 각종 파아지에 대한 연구가 계속 진행되어 왔다.

파아지 치료는 1921년 Bruynoghe와 Maisin¹³⁾이 포도구균성 피부질환을 파아지로 처리함으로써 시작되었다. 항생제와 sulfonamide시대 이전에는 이 치료법이 아주 관심의 대상이었다. 그래서 pyogenic & urinary infection, cholera, dysentery, plague, typhoid, paratyphoid fever 등 여러질병에 치료법으로 시도되었다^{31,32)}. 그러나 항생제의 등장으로 인하여 파아지의 치료법은 사라지게 되었지만 최근 파아지를 질병의 치료에 이용하려는 연구가 다시 시작되고 있다. 요즘은 항생제 내성인 세균이 증가하고, 원내감염도 증가하기 때문이다. 이러한 파아지 치료법은 항생제 치료법보다 우수한 적어도 한가지의 잇점이 있는데, 파아지는 live vaccine과 동일한 위치를 점한다는 점이다. 즉, 항생제의 농도가 적용의 순간으로부터 감소하는 반면, 파아지수는 적어도 이론적으로는 증가한다. 다른 잇점은 파아지가 널리 퍼질 수 있어서 질병을 방지할 수 있다는 것이다. 그럼에도 불구하고 인체에 있어서의 그들의 증식, 항체, 혈청 등에 의한 불활성화, 감수성 세균의 용균에 의한 endotoxin의 방출 등 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다. 이러한 배경으로 저자는 해산물을 생식하는 우리나라와 일본 등지에서 가장 잘 알려져 있으며, 인체에 감염하면 급성위장염을 야기시키지만 예방은 아직도 위생적인 측면에서 밖에 이루어지지 않고 있는 실정인 *V. parahaemolyticus* 파아지를 분리하여 기본적인 특성을 밝혔으며, 이를 토대로 하여 파아지의 치료제로서의 가능성을 알아보려고 하였다. 먼저 해양으로부터 숙주균인 *V. parahaemolyticus*를 분리하고, 이 숙주균을 대상으로 다시 해산물에서 파아지인 VPP97을 분리하였다. 이들은 BHI 한천 평판배지상에서 0.6~1.0 mm의 투명한 용균반을 형성하였다. 그리고 sucrose 밀도구배 원심분리결과 70% 상층에, CsCl 밀도구배 원심분리결과 p 1.50 상층에 하나의 밴드를 형성하였으며, 음성염색법을 이용하여 전자 현미경으로 관찰하였더니, 세로 60 nm, 가로 34 nm의 직육각형 두부와 수축성의 미부를 가진 파아지로서 형태상으로 국제 바이러스 분류위원회의 분류에 의하면 Myoviridae과에 속하는 것으로 추정된다. 파아지의 안정성에 관한 시험에서, 온도에 대한 안정성에서는 40℃까지 안정하였으나 40℃부터 활성을 잃기 시작하여 70℃에서는 완

전히 불활성화되었고, pH에 대한 안정성에서는 pH 5~10 범위의 광범위한 안정성을 나타내었다. 이 VPP97은 비브리오후속하는 *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*에도 감수성이 있었다. 따라서 이 파아지가 치료제로서의 이용가능성이 있을 경우 이들 균주에도 이용가능하다. 이 파아지는 핵산을 분리한 뒤 전기영동한 결과 분자량 마커 23 kb 윗쪽에서 하나의 밴드를 확인할 수 있었다.

RNase처리에는 분해되지 않았으나 DNase처리에 의해 분해되는 것으로 보아 유전물질로 DNA를 가진다는 것을 확인할 수 있었다. VPP97의 구조단백질을 알아보기 위하여 SDS-PAGE 하여 Coomassie blue 염색한 결과 21.5 kDa와 97.4 kDa 사이에 9종류의 단백질을 가지고 있으며, 각 단백질의 양은 다소 차이가 있었다. 이와 같은 VPP97의 기본적인 특성을 주 등이 보고한 *Vibrio*속 파아지와 비교했을 때, 보고된 대부분의 *Vibrio*속 파아지의 핵산은 VPP97과 동일한 DNA로 구성되어 있었다. 온도 안정성에 있어서는 VPP97은 70℃ 이상에서 불활성화 되는 전형적인 특징을 보였으며, pH안정성에 있어서는 대부분의 *Vibrio*속 phage는 안정범위가 좁은 반면, VPP97은 pH5에서 pH10까지의 넓은 범위에서 비교적 안정하였다. 지금까지의 보고에 의하면 VPP97를 비롯한 *Vibrio*속 파아지는 그 형태나, 용균반의 형태 및 크기는 다양하여, 어떤 세균속에는 어떤 형태의 파아지가 감염한다는 경향을 나타내지는 않았다. VPP97은 그 숙주역이 다른 *Vibrio*속 파아지에 비해 넓은 것으로 나타났는데, 이런 특징은 VPP97를 치료목적으로 사용할 때, 사용범위를 넓힐 수 있는 잇점으로 사료된다.

파아지가 숙주에 감수성이 있는 여러 항생제와 비교하여 균저해에 대해 효과가 있는지 알아보기 위하여 숙주에 각각의 항생제를 처리하고 나서 2시간 후의 생균수를 측정하였다. *V. parahaemolyticus*에 감수성이 있는 chloramphenicol, erythromycin, tetracycline의 경우 tetracycline의 효과가 가장 뛰어나고 다른 두 항생제의 경우는 효과가 거의 없었다. 내성이 있는 penicillin의 경우도 마찬가지로 거의 효과가 없었다. 위의 감수성이 있는 항생제와 파아지 VPP97를 비교했을 때는 파아지 VPP97은 tetracycline보다는 효과가 조금 떨어지지만 다른 항생제 보다는 월등히 좋은 효과를 보였다. 따라서, 파아지 VPP97은 tetracycline에

내성이 있는 *V. parahaemolyticus*에 대해서 좋은 치료제가 될 수 있으리라 생각된다. 파아지를 치료제로 이용했을 때의 치료 효과를 관찰하기 위하여 장내 숙주균 생균수의 변화, 장의 조직변화 등을 검토하였다. 장내 숙주균 생균수 변화에 있어서는 VPP97 처리구와 VPP97 비처리구를 비교하였을 때, VPP97비처리구는 3마리의 마우스 중 1마리는 죽고 2마리가 살아 있었으며, VPP97 처리구는 3마리 모두 살아 있었다. 그리고 이들 장을 일정부분 채취하여 숙주균의 생균수를 측정하였을 때, VPP97 처리구는 생균수가 1.64×10^7 CFU/ml이었고, VPP97 비처리구는 2.1×10^8 CFU/ml이었다. 조직처리한 후 현미경으로 실험조직을 관찰한 결과 소장 용모의 괴사는 모두 일어났으나, VPP97 비처리구보다 VPP97 처리구가 손상을 덜 입었음을 보여준다. 이러한 결과는 파아지를 치료제로 이용할 수 있다는 가능성을 보여준다. 이상의 결과로 *V. parahaemolyticus* 파아지 VPP97의 기본적인 특성을 밝혀내었으며, 이를 토대로 파아지의 치료 효과에 대해 검토하여 파아지의 치료제로서의 가능성을 확인하였다. 용균활성이 강한 파아지의 screening이 이러한 가능성에 더욱 접근하게 하리라고 사료되었다.

결 론

해양으로부터 *Vibrio parahaemolyticus* 파아지를 1주 분리하여 이를 *V. parahaemolyticus* 파아지 97 (이하 VPP97이라 칭함)이라 명명하고, 이를 정제하여 전자현미경으로 형태를 관찰하고, 숙주역 시험, 온도·pH에 대한 파아지의 안정성 시험, 핵산의 분리 및 확인, 구조단백질 분석 및 파아지와 항생제의 균저해 비교시험, 마우스를 이용한 장 감염시험 등을 연구하여 다음의 결론을 얻었다.

V. parahaemolyticus 파아지의 용균반은 BHI (brain heart infusion) 평판배지에서 직경 0.6~1.0 mm의 투명한 용균반을 형성하였다.

V. parahaemolyticus 파아지는 sucrose 밀도구배 원심분리 결과 70% 상층에, CsCl 밀도구배 원심분리의 결과 ρ 1.50 상층에 파아지 띠를 형성하였다.

형태학적으로 *V. parahaemolyticus* 파아지는 직육각형의 두부와 수축성의 미부를 가졌고, 국제 바이러스 분류위원회에 의하면 *Myoviridae*과라고 추정된다.

숙주역 시험에서는 *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, 그리고 해양에서 분리한 *V. parahaemolyticus*에 감수성이 있었다.

온도, pH에 의한 안정성에서 온도는 40℃까지는 안정하였으나 40℃ 이상에서는 점차 감수성이 증가하여 70℃에서는 거의 모든 파아지가 불활성화 되었고, pH는 pH5에서 pH10 사이에서 80% 이상의 안정성을 나타내었다.

파아지의 핵산을 분리하여 조사한 결과 분자량 마커 23 Kb 윗쪽 하나의 밴드를 확인하였으며, DNase로 분해되었으므로 DNA로 판명되었다.

구조 단백질 분석결과 21.5 kDa~97.4 kDa 사이에 9종류의 구조 단백질이 있었다.

파아지와 항생제의 균저해 비교시험에는 파아지가 tetracycline을 제외한 다른 항생제보다 더 나은 결과를 보였다.

파아지의 장감염시험에 있어서도 파아지를 치료제로 이용하였을 때 이용하지 않은 것보다 균수가 줄어들고 조직상의 상해도 덜한 것으로 밝혀졌다.

참 고 문 헌

- 1) 주진우, 이미현: 한국 남해안일대의 장염비브리오 분포에 관한 연구-부산, 마산, 충무 및 울산근해의 해수, 해니 및 각종 해산물에서 장염비브리오의 분리. 부산대학교 자연과학대학논문집 **51**: 191, 1986.
- 2) 주진우, 이미현, 김일: 한국 울릉도 근해의 비브리오속의 분리연구. 대한미생물학회지 **21**: 345, 1986.
- 3) 주진우, 김일: 한국 남해안 일대의 해수 및 해산물에서 *V. vulnificus*의 분리연구. 대한미생물학회지 **21**: 97, 1986.
- 4) 주진우, 이기희, 김일: *V. parahaemolyticus*의 phage에 관한 연구. 대한미생물학회지 **22(1)**: 61-70, 1987.
- 5) 주진우, 김영희: 각종 적혈구에 대한 장염비브리오의 용혈성에 관한 연구. 대한미생물학회지 **19**: 1, 1984.
- 6) 주진우: *V. furnissi* phage의 분리 및 특성. 대한미생물학회지, **29(6)**: 685-697, 1994.
- 7) 주진우, 윤소겸: *V. parahaemolyticus*의 용원성 박테리오파아지의 특성. 부산대학교 자연과학대학논문집 **55**: 133-148, 1993.

- 8) 주진우, 박은주, 김영자: *V. mimicus* phage의 분리와 특성. 부산대학교 자연과학대학논문집 **54**: 97-109, 1992.
- 9) 주진우, 배혜정: *V. alginolyticus* phage의 분리와 특성. 부산대학교 자연과학대학논문집 **52**: 143-153, 1991.
- 10) 주진우, 김일, 박형숙: *V. vulnificus* bacteriophage의 분리와 전자 현미경적 구조. 대한미생물학회지 **24(5)**: 487-496, 1989.
- 11) Adams MH, et al: Bacteriophages. Interscience Pub Inc New York, 1959.
- 12) Bockemuhl J, et al: Value of phage typing of *V. cholerae* biotype eltor in West Africa. *Bull WHO* **54**: 187, 1976.
- 13) Bruynoghe R, et al: Essais de therapeutique au moyen du bacteriophage. *C R Soc Biol* **85**: 1120, 1921.
- 14) Dennis H, et al: The lytic enzyme of the *Pseudomonas* phage 6. Purification and biochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* **1159**: 44-50, 1992.
- 15) Dennis H, et al: Purified 6 nucleocapsids are capable of productive infection of host cells with partially disrupted outer membranes. *Virology* **178**: 364-372, 1990.
- 16) Fujino T, et al: A thermolabile direct hemolysin of *V. parahaemolyticus*. *Biken J* **12**: 145-148, 1969.
- 17) Hosaka Y, et al: Isolation and properties of bacteriophages of *V. parahaemolyticus*. *Biken J* **9**: 149, 1966.
- 18) H Williams Smith, et al: Effectiveness of Phages in Treating Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves, Piglets and Lambs. *Journal of Microbiology* **129**: 2659-2675, 1983.
- 19) H Williams Smith, et al: Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* AInfections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. *Journal of Microbiology* **128**: 307-318, 1982.
- 20) Sambrook J, et al: Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- 21) Jaana KH, et al: Large-scale purification of membrane-containing bacteriophage PRD 1 and its subviral particles. *Virology* **181**: 348-352, 1991.
- 22) Kato T, et al: Hemolytic activity and toxicity of *V. parahaemolyticus*. *Jap J Bacteriol* **21**: 442-443, 1966.
- 23) Kouichi Muramatsu, et al: Two generalized transducing phages in *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. *Microbiol Immunol* **35(12)**: 1073-1084, 1991.
- 24) Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680, 1970.
- 25) Mahy BWJ: Virology, a practical approach. IRL press, 1985.
- 26) Miwatani T, et al: Effect of heat (Arrhenius effect) on crude hemolysin of *V. parahaemolyticus*. *Infect Immunity* **6**: 1031-1033, 1972.
- 27) Miyamoto Y, et al: In vitro hemolytic characteristic of *V. parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J Bacteriol* **100**: 1147-1149, 1969.
- 28) Monsur KA, et al: Effect of Mukerjee's group IV phage on El Tor vibrios. *Bull WHO* **32**: 211, 1965.
- 29) Mukerjee S: The bacteriophage-susceptibility test in differentiating *Vibrio cholerae* and *Vibrio el tor*. *Bull WHO* **28**: 333, 1963.
- 30) Obara Y: Studies on hemolytic factors of *V. parahaemolyticus*. The extraction of hemolysin and its properties. *J Jap Assoc Infect Dis* **45**: 392-398, 1971.
- 31) Raettig H: *Bakteriophagie 1917 bis 1956. I. Einfuhrung, Sachregister, Stichwortverzeichnis*. Gustav-Fische Verlag, Stuttgart, 1958, 53, 145 and 158.
- 32) Raettig H: *Bakteriophagie 1957-65. I. Einfuhrung, Sachregister, Stichwort -Index*. Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, 1967, 98, 274 and 284.
- 33) Sklarow SS, et al: Characteristics of *V. parahaemolyticus* bacteriophage isolated from Atlantic coast sediment. *Can J Microbiol* **19**: 1519, 1973.
- 34) Smith LS, et al: Characteristics of a new *Vibrio* bacteriophage system. *J Gen Physiol* **38**: 161, 1954.
- 35) Sonnenschein C: Die Verwendbarkeit der Bak-

- teriophagie für die bakteriologische Diagnose. *Munch Med Wochenschr* 1443, 1925.
- 36) Spencer R: A marine bacteriophage. *Native* **1975**: 1960, 1955.
- 37) Takeya K, et al: "Prophage typing" of El Tor vibrios. *J Bacteriol* **85**: 957, 1963.
- 38) Tetsuyoshi Inoue, et al: A 26-kDa outer membrane protein, Omp, common to *Vibrio* species is the receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP 40. *FEMS Microbiol Lett* **125**: 101-106, 1995.
- 39) Tetsuro Koga, et al: Isolation and Characterization of the Outer Membrane from *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Microbiology* **129**: 3185-3196, 1983.
- 40) Valentine AF, et al: Structure of a marine bacteriophage as revealed by the negative staining technique. *J Bacteriol* **91**: 819, 1966.
-