

## Urease를 생산하는 *Vibrio parahaemolyticus*의 분리 및 urease 생산

김종숙 · 김영희\*

동의대학교 미생물학과

### Isolation of Urease Positive *Vibrio parahaemolyticus* and Urease Production

Jong-Sook Kim and Young-Hee Kim\*

Department of Microbiology, Dong-eui University, Pusan, 614-714, Korea

#### Abstract

Urease is an important microbial enzyme and its production is a marker to predict potential pathogenicity. An unusual halophilic bacterium producing urease was isolated from sea product and identified as *Vibrio parahaemolyticus* KH410. Its biochemical properties were indole negative, gelatin positive, sodium citrate positive and Kanagawa positive whereas other characteristics were identical as the standard strain except it showed a positive reaction on Christensen's urea agar. *V. parahaemolyticus* urease production was directly related to urea concentration. The production of urease was noticeable by the addition of 0.2% urea, 0.5% glucose, 2% NaCl in LB broth, and the initial pH of 5.5. The maximum production reached after 6 hr of incubation at 37°C. However, NiCl<sub>2</sub>, metal ions, phosphorus did not affect production of urease.

**Key words** – Urease, *Vibrio parahaemolyticus*

#### 서 론

Urease는 사람 및 동물의 요로 및 장에 독력인자로 작용하며 세포독성을 유발하고[3] 이 효소를 생산하는 세균은 강산이 분비되는 위벽 및 장의 상피세포에 서식할 수 있는 요인을 제공한다고 알려져 있다. 또한 urease에 의한 암모니아 생성이 사람이나 동물의 위 이외에도 비뇨기계나 호흡기에도 작용하여 신우염을 유발하는 효소로도 알려져 있어 병원성 세균의 중요한 발병 결정인자로 주목되기 시작하였다[9].

근년에 이르러 세균에 의한 urease생산이 장내세균의 생존에 영향을 미치는 인자라는 것이 밝혀졌으며 urease는 일부세균에서 기질의 존재여부에 관계없이 생성하는 구성효소의 일종으로 장내세균의 동정법이나 병원성 세균의 판독에 이용된다[1,4,12].

*Vibrio*속에 속하는 균주는 약 40여종이며, 이 중에서 인간에게 병원성을 나타내는 것은 12종으로 알려져 있다[14]. 이런 병원성 *Vibrio*는 이들 균에 오염된 생선회나 해산물을 섭취한 사람들에게 식중독, 패혈증, 창상감염등의 질환을 일으키고 있으며 복통이나 설사등을 유발한다[7]. 이들중 *Vibrio parahaemolyticus*는 해수와 어패류를 비롯한 각종 해산물에 분포하는 호염성 세균으로 수온, 염농도, pH, 유기물량 등에 의하여 증식에 많은 영향을 받으며 여러 대사산물

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel: 051-890-1535, Fax: 051-890-1532  
E-mail: yhkim@hyomin.dongueui.ac.kr

을 생성한다[13]. 이미 여러세균이 urease를 생산하는 것으로 보고 되어있었으나 해양환경에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 균주 중에서는 약 8% 정도가 urease 양성을 나타내고[10], 임상분리주에서는 더 많은 urease를 생성하는 균주의 보고사례도 있다[2,6].

본 균의 병원성 물질로 지금까지는 세포외 물질인 내열성(Thermostable Direct Hemolysin), 이열성(Thermolabile Related Hemolysin) 용혈독의 연구가 집중적으로 이루어져 왔다[6]. 아직까지 *V. parahaemolyticus*가 urease를 생성하는 이유나 이 효소의 기능이 완전히 규명되어 있지는 않다.

본 연구에서는 지금까지 국외[2] 및 국내보고 사례가 없는 해양환경유래 Kanagawa양성, urease를 생산하는 *V. parahaemolyticus*를 검색하게 되어 그 성상을 밝히는 과정의 일환으로 본 균의 새로운 병원성인자의 규명을 위하여 세포내 병원성 물질로 알려진 urease의 생산에 영향을 미치는 조건을 검토하게되어 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

한국 남해안의 해산물에서 균주를 분리하고 동정한 후 사용하였으며, 표준 균주로는 *V. parahaemolyticus* O10:K52, O3:K57 혈청형을 사용하였다.

### 균주의 생화학적 특성

분리균의 생화학적 특성 규명은 API kit (Bio Merieux 20E)를 사용하여 자동분석으로 확인하였으며 혈청형 확인은 *V. parahaemolyticus* antisera (Denka Seiken, Japan)로 확인하였다.

### 사용 배지

분리용 배지로는 Thiosulfate citrate bile salt(TCBS)를 사용하였고, urease 생성확인으로는 Christensen's urea agar 및 Bacto urea broth (Difco 社)에 2% NaCl을 첨가하여 사용하였다.

균배양의 기본배지로는 LB(Luria Bertani) 배지에 2% NaCl을 첨가하여 사용하였다.

### 균의 생육도 및 단백질 정량

균의 생육도는 분광광도계 (Shimadzu UV-160A)로 600

nm에서 흡광도로 측정하였고 단백질 정량은 분광광도계를 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하는 방법과 Lowry 법[11]을 사용하였다.

### 균체 파쇄액

전배양액을 2-3% 균배양액에 첨가한 후 37°C에서 6-7시간 배양하여 그 배양액을 원심분리하여 (8,000 rpm, 10 min, 4°C) 침전물을 생리식염수로 부유액을 만들어 다시 원심분리 한 뒤 생리 식염수로 2회 세척하였다. 이를 20 mM 인산 완충액 (pH 7.0)으로 재 부유시켜 한번 더 세척한 다음 초음파파쇄기(Sonifer 250, Branson)를 이용하여 균체를 파쇄한 후 원심분리 (12,000 rpm, 10 min, 4°C)하고 상등액을 균체 파쇄액으로 사용하였다.

### Urease 활성 측정법

Urease의 효소활성은 Weatherburn[15] 방법을 이용하였는데, 즉 기질인 요소가 분해되어 생성되는 암모니아를 hypochlorite 존재하에서 phenol과 반응시켜 indophenol로 전환시킨 후 나타나는 발색정도를 정량하여 측정하였다. 효소반응액 50  $\mu$ l를 200  $\mu$ l UHEP (20 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 30 mM urea, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mecaptoethanol)와 30분간 37°C에서 반응시킨 후, phenol nitroprusside 400  $\mu$ l와 alkaline hypochlorite 400  $\mu$ l를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시키고 그 후 즉시 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 1분 동안 암모니아 1  $\mu$ M을 유리시키는데 필요한 urease의 량으로 하였다.

### Urease 생산 조건

증식용 기본배지인 LB 배지를 사용하여 여기에 urease 생산에 영향을 미치는 인자를 조사하기 위하여 urea를 농도별로 첨가하였고 탄소원으로는 xylose, fructose, lactose, arabinose, cellobiose, sorbitol, glucose, galactose, saccharose, mannitol, maltose을 이용하였고, 인산염은  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  그리고 무기염으로는  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ 등을 사용하였다. 배양조건은 초기 pH 그리고 배양온도를 조사하였다. 각각의 조건과 배지에서 시간별로 배양한 다음 균체를 수집하여 초음파 파쇄기로 파쇄한 다음 상등액을 회수하여 urease

생산력을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 생화학적 성상

본 실험에서 사용한 *V. parahaemolyticus*의 생화학적 특징을 API 20E kit를 사용하여 확인한 결과로 균주의 생화학적 성상은 Table 1에 나타내었다. 실험에 사용된 균주의 혈청형은 O1:K1이며, Kanagawa 양성으로 확인되었으며, *V. parahaemolyticus* KH410으로 명명하여 사용하였다. 대조균주 K25, K57 혈청형과의 차이점은 구연산 이용 양성, urease 양성, indole 음성, gelatin 양성으로 나타났고, 그외 다른 성상은 표준 균주와 같았다. Honda[6]가 기술한바와 같이 분리원 및 지역에 따라 다양한 양상의 *V. parahaemolyticus*

가 분리될 수 있다는 것으로 볼 때, 혈청형에 따른 생화학적 특성 및 Kanagawa 양성 및 음성과의 관계 및 urease 생산성 여부엔 분리원 및 지역에 따라 다소 차이가 있을 것으로 사료되어졌다[7].

### Urease 생성의 확인

Bacto urea broth에서 균주를 배양하였을 때 짙은 분홍색으로 변화된 *V. parahaemolyticus* O1:K1 균주를 확인 할 수 있었다. Cai[2]의 보고에 의하면 urease를 생산하는 *V. parahaemolyticus*는 특정한 혈청형과 관련있다고 주장하였고, 본 연구에서 사용된 균주 중에서는 O1:K1혈청형만이 urease를 생산하였고, 그외 어떤 다른 혈청형의 *V. parahaemolyticus*가 urease를 생산하는 지에 관해서는 앞으로 더 많은 다양한 혈청형을 대상으로 검토하여야 할 것으로 판단된다.

Table 1. Biochemical characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*

Tests*	Strains		
	KH410	K25	K57
Urea hydrolysis	+	-	-
Ortho-Nitro-Phenyl-Galactoside	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Lysine	+	+	+
Ornithine	+	+	+
Sodium citrate	+	-	-
Sodium thiosulphate	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole	-	+	+
Voges Proskauer	-	-	-
Gelatin	+	-	-
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	-	-	-
Arabiose	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Kanagawa**	+	+	+

\*Tests were performed by API kit (Bio Merieux 20E).

\*\*Kanagawa phenomenon on Wagatsuma blood agar.

### Urease 생산에 영향을 미치는 인자

#### 요소 농도

요소를 농도별로 조정된 증균용 배지에 전 배양액을 첨가하여 6시간 진탕배양한 후 urease 생산성을 검토한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 요소를 첨가하지 않은 배양 배지에서는 균의 성장도 아주 미약하였고 활성도 극히 미약하였다. 그리고 요소농도가 0.2% 첨가된 배지에서는 활성이 가장 높았고 0.3% 이상 첨가시켜 배양시키면 urease 생산이 감소하는 것이 관찰되었다. 이로써 본 실험에 사용된 균주는 구성효소이면서 기질인 요소를 첨가시켜 줄 때, urease를 많이 생성하는 유도 효소임을 알 수 있었다.

#### 초기 pH

배양 초기 pH별로 균의 생육도를 비교하였을 때 pH 5.5에서 8.0에 걸쳐 높은 생육도를 보였다. Urease 생산성을 검토한 결과 Table 3에서와 같이 pH 5.5, 6.0에서 urease의 생산이 가장 많았고 pH 7.0은 8.0보다도 낮은 활성을 나타내었으며 pH 4.5와 pH 9.0도 균의 생육도 및 urease활성이 아주 낮았다. 이로써 urease생성을 위한 최적 pH조건은 5.5임을 알 수 있었다.

#### 탄소원

탄소원에 대한 urease 생산성을 검토한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 균의 증식은 모든 탄소원의 첨가에서

Table 2. Effect of urea concentration on the production of *Vibrio parahaemolyticus* KH410 urease

Urea concentration(%)	Final pH	Cell growth OD600	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
0.0	4.68	0.63	4.6	1,018	221
0.1	5.53	1.75	9.5	18,440	1,941
0.2	6.67	3.28	11.4	79,880	7,007
0.3	7.60	3.74	10.6	46,280	4,366
0.5	8.03	3.42	9.0	1,324	147
1.0	8.45	0.85	3.6	214	59

Cultivation was carried out at 37°C in a basal medium.

Table 3. Effect of initial pH on the production of *Vibrio parahaemolyticus* KH410 urease

Initial pH	Final pH	Cell growth OD600	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
4.5	5.58	0.27	1.9	281	148
5.0	6.70	3.30	11.1	18,867	1,700
5.5	6.67	3.28	11.7	79,880	7,132
6.0	6.67	3.42	11.5	77,213	6,706
7.0	6.89	3.42	10.7	53,800	5,028
8.0	7.33	3.45	13.5	81,960	6,071
9.0	7.91	2.76	10.8	4,138	383

Cultivation was carried out for 6~7 hrs at 37°C in a basal medium containing 0.2% urea.

Table 4. Effect of carbon sources on the production of *Vibrio parahaemolyticus* KH410 urease

Carbon sources	Final pH	Cell growth OD600	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
None	8.24	0.95	6.8	1,948	2,867
Xylose	8.16	0.28	5.0	18,663	3,733
Fructose	5.77	2.64	9.0	77,057	8,562
Lactose	7.90	0.90	6.7	9,480	1,415
Arabinose	6.77	2.82	8.9	47,607	5,349
Cellobiose	8.07	0.98	6.5	4,313	664
Sorbitol	8.17	1.28	5.7	9,543	1,674
Glucose	6.64	2.90	10.0	88,773	8,877
Galactose	6.97	2.44	10.6	75,663	7,138
Saccharose	7.75	1.11	7.4	56,347	7,615
Mannitol	6.69	1.84	10.6	85,037	8,022
Maltose	6.17	2.99	10.4	85,417	8,213

Cultivation was carried out for at 37°C in a basal medium containing 0.2% urea with initial pH 5.5.

비교적 좋았으나 xylose, lactose, cellobiose, sorbitol의 경우는 균의 성장도 미약하였고 urease의 생성도 대체로 낮았다. Fructose, arabinose, glucose, mannitol, maltose를 첨가한 경우가 당을 첨가하지 않은 대조군과 비교할 때 3배 정도 높은 활성을 나타내었다.

인산염

기본 배지에 각종 인산염 0.1%를 첨가하여 urease 생성을 검토한 결과는 Table 5에 나타난 바와 같다. 모든 인산염에서 균의 증식은 좋았고 효소 활성도 인산염을 첨가하지 않은 기본배지와 비교하여 대부분 비슷하게 urease

Table 5. Effect of phosphorus on the production of *Vibrio parahaemolyticus* KH410 urease

Phosphorus sources (0.1%)	Final pH	Cell growth OD600	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
None	6.89	3.01	11.5	95,593	8,312
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.68	2.33	10.7	73,953	6,912
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.87	2.69	11	72,370	6,579
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.50	2.91	12.8	76,740	5,995
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.28	3.17	10.8	89,217	8,261
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.62	3.45	14	82,947	5,925
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.24	3.17	11.7	51,533	4,405

Cultivation was carried out for 6~7 hrs at 37°C in a basal medium containing 0.5% glucose, 0.2% urea with initial pH 5.5.

활성을 나타내었다. 따라서 인산염은 본 균의 urease생산에 별로 영향을 미치지 않았다.

금속이온

각종 금속이온을 첨가하여 urease생산에 대한 영향을 조사하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 HgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>를 첨가하였을 때는 균의 생육도 낮았고 활성도 극히 저조한 것으로 보아 이들 금속이온은 urease생산을 저해하는 것으로 나타났다. 이같은 결과는 몇몇 특이적 urease의 저해제는 균의 성장을 저해함으로 균 성장에 있어서 urease의 활성에는 큰 영향을 미친다고 보고한 것과 일치하였다[5,9].

NiCl<sub>2</sub> 농도

지금까지의 연구자들의 비교에 의하면[3] urease는 니켈

과 결합되어 있는 효소이므로 본 실험에 사용한 균주의 배양액속의 Ni<sup>2+</sup>의 요구를 검토하기 위하여 NiCl<sub>2</sub>를 농도별로 첨가하여 37°C에서 6시간 진탕 배양한 결과 Table 7에서와 같이 NiCl<sub>2</sub>를 100 μM 넣은 배지와 NiCl<sub>2</sub>를 넣지 않은 기본배지의 활성이 비슷하였으며 NiCl<sub>2</sub>를 5 mM 첨가하였을 경우엔 균의 성장도 미약하였고 활성도 아주 낮았다. 이같은 결과는 본 균은 배양액속에 Ni<sup>2+</sup>의 공급 없이도 urease를 생산하는 것으로 판단되었다.

온도

*Vibrio*속은 해수의 온도가 높아지는 계절에 증식이 빠른 것으로 알려져 있어 배양온도를 20°C에서 45°C까지 각 온도별로 조정하여 urease 생산성을 측정한 결과 Table 8에서 보는바와 같이 37°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고 40

Table 6. Effect of metal ion on the production of *Vibrio parahaemolyticus* KH410 urease

Mineral salts	Final pH	Cell growth OD600	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
None	6.89	3.01	11.5	95,593	8,312
MgSO <sub>4</sub>	6.32	4.57	13.2	52,040	3,942
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5.73	2.50	11	60,400	5,491
HgCl <sub>2</sub>	5.78	0.66	1.9	-	-
ZnSO <sub>4</sub>	5.82	3.66	6.7	589	88
CuSO <sub>4</sub>	5.63	0.17	2.45	89	36
AgNO <sub>3</sub>	5.52	0.27	1.2	-	-
MnSO <sub>4</sub>	5.94	2.77	9.25	5,856	633
CaCl <sub>2</sub>	6.48	4.66	14.9	95,867	6,434
CoCl <sub>2</sub>	5.70	0.80	0.54	55	102
FeSO <sub>4</sub>	5.76	2.68	9.0	74,034	8,226

Cultivation was carried out for 6~7 hr at 37°C in a basal medium containing 0.5% glucose, 0.2% urea with initial pH 5.5.

Table 7. Effect of NiCl<sub>2</sub> concentrations on the production of *Vibrio parahaemolyticus* KH410 urease

NiCl <sub>2</sub> concentration	Final pH	Cell growth OD600	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
None	6.89	3.01	11.5	87,112	7,575
NiCl <sub>2</sub> 10 μM	6.23	3.43	16.0	89,857	7,488
NiCl <sub>2</sub> 100 μM	6.22	3.50	13.2	92,827	7,032
NiCl <sub>2</sub> 1 mM	6.21	3.41	12.0	48,937	4,078
NiCl <sub>2</sub> 5 mM	5.17	0.18	2.0	563	282

Cultivation was carried out for 6~7 hr at 37°C in a basal medium containing 0.5% glucose, 0.2 % urea with initial pH 5.5.

Table 8. Effect of temperature on the production of *Vibrio parahaemolyticus* KH410 urease

Temperature(°C)	Final pH	Cell growth OD600	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
20	6.29	2.19	8.3	24,842	2,993
25	6.27	3.59	9.0	57,042	6,338
30	6.24	3.75	8.3	65,532	7,867
37	6.67	3.28	11.4	93,475	8,988
40	6.07	1.68	4.8	11,438	2,385
45	6.72	1.24	1.6	1,002	173

Cultivation was carried out for 6~7 hr at various temperatures in a basal medium containing 0.5% glucose, 0.2 % urea with initial pH 5.5.

°C, 45°C에서는 균의 생육도 낮으면서 급격히 낮은 urease 활성을 나타내었다.

Urease 최고 생성 시간

앞에서 검토한 조건을 적용하여 *V. parahaemolyticus* urease의 최대 생산시간대를 검토한 결과는 Fig. 1과 같이 전 배양액 접종 후 6시간대에 urease 생성이 최고에 달하였다.

요 약

*V. parahaemolyticus*의 새로운 병원성 인자인 세포내 효소인 urease특성을 밝히기 위한 과정에서 본 균에 의한 urease 생산성은 다음과 같았다.

1) 해산물에서 urease를 강하게 생산하는 *V. parahaemolyticus* KH410을 선별하였고, Kanagawa양성이고 혈청학적 분류는 O1:K1형에 속하였다.

2) 분리균의 생화학적 특성은 Gram 음성의 간균으로 indole 생산력을 가지지 않았고 gelatin액화력, 구연산을 이용하는 특성으로 urease 생산력만 제외하고는 *V. par-*

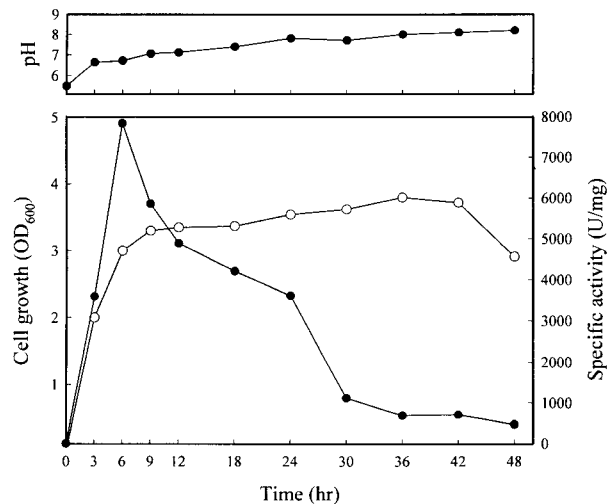


Fig. 1. pH change, cell growth and specific activity of urease according to culture time of *Vibrio parahaemolyticus* KH410.

Symbols: —○—: Cell growth (A600nm), —●—: Specific activity (U/mg).

*ahaemolyticus*의 전형적인 특징과 일치하였다.

3) Urease생산은 urea 농도를 0.2%첨가 시켰을 때 urease

를 가장 많이 생산하는 유도효소이었고, 초기 pH는 5.5일 때가 가장 많은 urease를 생산하는 것으로 판명되었고, 접종 후 37°C에서 6시간대에 생산이 최대에 이르렀다.

4) 탄소원으로는 0.5%의 glucose를 첨가하였을 때 urease의 생산이 최대를 나타내었다.

5) 금속이온들은 urease 생산성을 억제하였으며 NiCl<sub>2</sub> 인산염도 urease 생산을 억제시키는 인자로 판명되었다.

### 참 고 문 헌

1. Barer, M. R., T. J. Elliott and D. Berkeley. 1988. Cytopathic effects of *Campylobacter pylori* urease. *J. Clin. Pathol.* **41**, 597.
2. Cai, Y. and N. Yuxing. 1996. Purification, characterization, and pathogenicity of urease produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Laboratory Analysis.* **10**, 70-73.
3. Carrthers, M. M. 1975. Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* in Hela cell culture. *J. Infect. Dis.* **132(5)**, 555-560.
4. Dunn, B. E., G. P. Campbell, G. I. Perez-perez and J. H. Baron. 1987. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **265**, 9464- 9469.
5. Ford, D. K. and J. Macdonald. 1967. Influence of urea on the growth of T-strain mycoplasma. *J. Bacteriol.* **93**, 1509-1512.
6. Honda, S., S. Matsumoto, T. Miwatani and T. Honda. 1992. A survey of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhea, sea water, and imported frozen sea foods. *Eur. J. Epidemiology.* **8(6)**, 861-864.
7. Honda, T. and T. Iida. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of thermostable direct hemolysin and related hemolysins. *Rev. Med. Microbiol.* **4**, 106-113.
8. Kaysner, C. A. 1994. Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in the Pacific Northwest. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(8)**, 3020-3022.
9. Kenny, G. E. and F. D. Cartwright. 1977. Effect of urea concentration on growth of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain mycoplasma). *J. Bacteriol.* **132**, 144-150.
10. Larsen, A. O. and R. E. Kallio. 1954. Purification and properties of bacterial urease. *J. Bacteriol.* **68**, 67-73.
11. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
12. Masover, G. K., J. E. Sawyer and L. Hatflick. 1976. Urea hydrolyzing activity of a T-strain mycoplasma: *Ureaplasma urealyticum*. *J. Bacteriol.* **125**, 58.
13. Miwatani, T. 1976. *Vibrio parahaemolyticus*. pp.58-99, Saikon Publishig Co. Japan.
14. Sakazaki, R., S. Iwanami and H. Fukumi. 1963. Studies on the enteropathogenic facultatively, halophilic bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **16**, 161-188.
15. Weatherburn, M. W. 1967. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry.* **39**, 971-974.