

## 부산과 대천 해안에서 *Vibrio vulnificus*와 *Vibrio parahaemolyticus*의 분리 및 동정

부산대학교 자연과학대학 미생물학과<sup>1</sup>, 부산대학교 일반대학원 미생물학과,  
제주대학교 해양과학대학 해양생산과학부<sup>2</sup>

주진우<sup>1</sup> · 박민정 · 허문수<sup>2</sup> · 정초록

=Abstract=

### Isolation and Identification of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* from Coast of Pusan and Daechon

Jin-Woo Ju<sup>1</sup>, Min-Jung Park, Moon-Soo Heo<sup>2</sup> and Cho-Rok Jung

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University<sup>1</sup>, Graduate School,  
Pusan National University, Faculty of Applied Marine Sciences, Cheju National University<sup>2</sup>

This study was focused on the isolation of pathogenic *Vibrio* species, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* from marine environment from May to July of 1999. Isolation sites were coast near by Pusan and Daechon. The results obtained were as follows:

1. Seventy strains of *V. parahaemolyticus* and 19 strains of *V. vulnificus* were isolated from a total of 120 specimens.
2. Nineteen strains of *V. vulnificus* did not fermented arabinose and salicin but fermented lactose and cellobiose. All of *V. parahaemolyticus* isolates did not fermented lactose and cellobiose. 47 strains of *V. parahaemolyticus* fermented arabinose but 53 strains did not fermented salicin.
3. *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* isolates showed three different API index numbers with 5046105 and 4346107 dominant.
4. *V. vulnificus* did not grow on 0% and 8% NaCl containing medium. *V. parahaemolyticus* grew on 8% NaCl containing medium.
5. *V. vulnificus* isolates and *V. parahaemolyticus* revealed different outer membrane protein p rofiles on SDS-PAGE.

**Key Words:** *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*

## 서 론

*Vibrio*속은 해수, 하천수, 어패류 등에서 분리되는 Gram 음성 간균으로서 운동성을 나타내며 전세계의 해안에 널리 분포하고 있으며 한국 남해안에서도

분리된 것으로 보고되어 있다<sup>1-4)</sup>. 최근까지 이 *Vibrio*속에 속하는 균종은 약 30여종으로 알려져 있으나 인체 병원성을 나타내는 것은 10여종으로 *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. damsella*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii* 등이다.

접수: 2000년 9월 1일, 게재결정: 2000년 12월 28일

책임저자: 주진우, 부산대학교 자연과학대학 미생물학과, 전화: 051-510-2266, 팩스: 051-514-1778

\*본 논문은 부산대학교 학술 연구조성비 (4년 과제)에 의한 연구임.

이 종들은 생선회와 해산물을 즐겨먹는 사람들에게서 위장염, 설사증, 패혈증<sup>9,10)</sup>을 일으키고 상처를 통해 감염하여 창상감염을 일으키며, 그 외 이염, 복막염, 폐렴, 뇌막염, 심내막염, 결막염, 자궁내막염, 전립선이나 경뇌막의 농양, 담낭염 등 다양한 감염을 일으킨다<sup>20,24)</sup>.

*V. parahaemolyticus* (장염 비브리오)는 해수 온도가 상승하면 균수가 급격히 증가하여 여름철 해수에서 빈번히 분리된다. 전세계적으로 여름철 식중독의 주요 원인균이며 특히 해산물을 생식하였을 때 심한 설사, 복통, 구토를 일으킨다.

*V. vulnificus*는 주로 하구나 연안의 바닷물에 사는 정상 해양 세균종의 한가지로 호염성균이다. 1976년 미국의 CDC (Center for Disease Control)의 Hollis<sup>18)</sup> 등이 다른 *Vibrio* species와 구별하여 lactose-positive *Vibrio*라고 명명하였으며, 1979년 Farmer는 이 균의 *Vibrio*속과의 유전적인 관계, 표현형의 유사성에 근거를 두고 "*Vibrio vulnificus*" 라고 명명할 것을 제안하여 현재 공식 균명으로 받아들여져 사용되고 있다<sup>13,14)</sup>.

*V. vulnificus* 감염증<sup>8)</sup>은 세계 도처에서 보고되고 있고 국내에서는 1979년 전남 해안지방에 피부 괴저병으로 수명이 사망하여 그 원인균으로 처음 알려지게 되었다. 이후 계속하여 국내 해안으로부터 *V. vulnificus*가 분리되고<sup>5,6,23)</sup> 있으며 현재까지 매년 여름 사망자가 나타나고 있어 하절기의 중요한 보건 및 사회 문제로 대두되고 있다<sup>11,12,16,19,22,25)</sup>. 우리나라 환자의 사망률은 평균 62~79%로 매우 높게 나타난다. 그리고 *V. vulnificus* 감염 환자의 사망률은 간 질환이 있는 사람이 없는 사람에 비해 2.7배 (63% 대 23%)나 높다.

그 외 당뇨병, 관절염, 결핵 등 만성 질환이 있는 환자에서도 발생하였으므로, 이러한 만성병을 가진 사람들은 어패류를 생식하거나 바닷물과 접촉하지 않도록 해야 한다. Hladý<sup>17)</sup> 등에 의하면 간 질환이 있는 사람이 굴을 생식하면 *V. vulnificus* 패혈증에 걸릴 위험은 정상인에 비해 80배 높고 사망 위험은 200배 높다고 하였다. 1981년에서 1992년 사이 Florida에서 보고된 바에 의하면 굴을 생식하고 발병한 *V. vulnificus* 감염 환자 72명 중 사망자는 36명이었다. 오염된 굴을 생식한 환자의 72명 중 36명 (50%)이 사망하였다.

본 연구는 99년 5월과 7월 사이의 부산과 서해안 근해의 해수, 해니와 해산물에서 대표적인 병원성 *Vibrio*속 균종인 *V. vulnificus*와 *V. parahaemolyticus*를

분리하여 그 분리 균주에 대한 생화학적 시험과 더불어 동정의 신속함과 정확함을 보완하기 위해 API 20E kit 시험과 외막단백질 (outer membrane protein) 구조 분석을 이용하여 균종의 조기 동정에 따른 효율적인 예방대책 수립을 위한 역학적인 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 채집

연안에 서식하고 있는 비브리오를 분리하기 위해 부산 일대의 해수욕장 두 곳과 중서부 대천 해수욕장을 채집 장소로 정하였다 (Fig. 1). 부산의 해수욕장 중에서 뻘이 많고 해수온이 높아 서남해안의 특징을 나타내는 다대포 일대와 부산의 동북단에 위치하여 동해안의 특징을 보이는 송정 해수욕장을 선택하였고, 비교적 비브리오의 분리율이 높은 것으로 알려져 있는 서해안 중에서는 대천 해수욕장을 선택하였다. 각 채집 장소의 해수, 해조류, 해산물 (어류, 조개류, 및 굴), 해니를 채취하였고, 해수 온도를 측정하였다.

### 2. 균주의 분리

각종 해산물은 멸균된 페트리 접시에 놓고 가위로 잘게 잘라서 각 2 g 씩, 해수는 2 ml 그리고 해

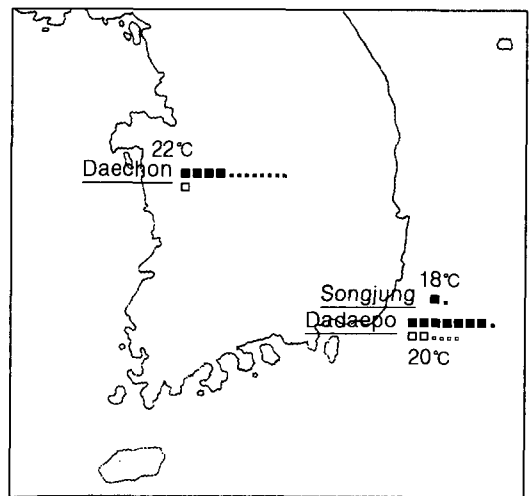


Figure 1. Sampling sites for the isolation of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*.

■; 5 strains of *V. parahaemolyticus* isolates, ■; 1 strain of *V. parahaemolyticus* isolates, □; 5 strains of *V. vulnificus* isolates, □; 1 strain of *V. vulnificus* isolates.

저펄은 2 g 씩을 증균배지 (3%-NaCl, alkaline peptone water)에 넣고 37°C, 18~24시간 배양하였다. 배양액으로부터 한백금을 취하여 Thiosulfate citrate bile salt (이하 TCBS, DIFCO) 배지에 도말하여 37°C, 18~24시간 배양 후, 모든 비브리오 속의 집락을 선별하고 그 중에서 다시 sucrose 비분해성인 직경 0.1~1 mm의 녹색 집락을 분리하였다. 이 집락을 다시 TCBS 배지에 도말한 후 배양하여 돌출형의 뚜렷한 녹색 집락을 선별하였다.

### 3. 분리균주의 동정

#### 1) 비교균주

분리균주와 비교, 검토하기 위해서 일본의 National Infectious Disease Center (NIDC, Tokyo)로부터 분양받은 *V. parahaemolyticus* serotype 04 균주와 *V. vulnificus* ATCC 27562를 표준균주로 사용하였다.

#### 2) 분리균주의 동정

TCBS 배지에 얻어진 녹색의 집락을 3% NaCl을 포함한 brain heart infusion (이하 BHI, DIFCO) 평판 배지에 옮겨서 얻은 단일의 집락을 대상으로 동정을 위한 중요 생화학적 시험을 실시하였고, 또한 API 20E kit (bio Merieux, France)로써 동정을 실시하였다.

##### (1) 중요 생화학적 시험

TCBS에서 sucrose 비분해성인 집락을 선택하여 다음과 같이 그 성상을 관찰하였다.

Arabinose, lactose, cellobise, salicin을 1% 첨가한 phenol red 액체배지에서 37°C, 24시간 배양한 색깔의 변화를 관찰하였다. 8% NaCl을 첨가한 BHI 액체배지에서 37°C, 24시간 배양한 후 증식을 관찰하였다.

##### (2) API 20E kit를 이용한 동정

평균된 식염수 5 ml에 BHI로부터 얻은 집락을 현

탁하여 탁도를 맞추고 API 20E kit의 각 웰에 200 µl 씩 넣고 37°C에서 배양 후 판독하였다.

### 4. 생화학적 시험으로 동정된 분리균주의 특성

분리된 *Vibrio*속들의 균주 중 *V. parahaemolyticus* 와 *V. vulnificus*로 동정된 균들에 대하여 다음과 같은 시험을 실시하였다.

#### 1) 당분해 시험

당분해 시험은 각종 당 (adonitol, arabinose, arabitol, cellobiose, dulcitol, galactose, glucose, lactose, mannitol, maltose, mannose, raffinose, rhamnase, sucrose, salicin 및 sorbitol, trehalose, xylose) 1%가 포함된 phenol red 액체배지에 접종하여 37°C, 24~48시간 배양한 후 색깔의 변화를 관찰하였다.

#### 2) 내염성 시험

내염성 시험은 식염을 각각 0, 1, 3, 6, 7, 8% 이 첨가된 BHI 액체배지에 접종 후 37°C, 24~48시간 배양 후 증균 여부를 관찰하였다.

#### 3) 외막단백질 분석

외막단백질 pattern 분석은 Filip et al<sup>15)</sup>의 방법으로 외막단백질을 추출해내어 SDS-PAGE로 분석하였다. 균주를 배양한 후 집균하여 Tris-EDTA-Azide-NaCl (TEAN, pH 8.0) buffer에 현탁시켜 Sonicator (B/braun, Germany)로 균체를 파쇄 (relative output 8, 2 min pulse) 후 5,000 ×g에서 20분 원심분리 하였다. 이후 얻어진 상청액을 100,000 ×g에서 1시간 동안 초원심분리 (Kontron, Swiss) 하여 막침전물 (membrane protein pellet)과 상청액의 원형질 단백질 (cytoplasm protein)을 분리하였다. 침전물을 1% sarcosine (C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>NNO<sub>3</sub>, Amresco)이 첨가된 TEAN buffer 에 현탁시켜 37°C에서 30분간 방치한 후 초원심분리기로 100,000 ×g에서 1시간 동안 원심분리하여

**Table 1.** Sites and samples from which *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* were isolated

Sample collection site	Strains	Seawater	Sediment	Seaweed	Fish	Total
Songjung	<i>V. parahaemolyticus</i>	0 <sup>a)</sup> /5 <sup>b)</sup>	1/5	0/5	5/5	6/20
	<i>V. vulnificus</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
Dadaepo	<i>V. parahaemolyticus</i>	14/15	8/15	5/15	9/15	36/60
	<i>V. vulnificus</i>	1/15	7/15	0/15	6/15	14/60
Daecheon	<i>V. parahaemolyticus</i>	8/10	5/10	7/10	8/10	28/40
	<i>V. vulnificus</i>	2/10	1/10	0/10	2/10	5/40

a) Number of strains of identified, b) Number of total *Vibrio* genus isolates.

용해성 내막단백질 (soluble inner membrane protein) 과 불용성 외막단백질 (insoluble outer membrane protein)을 분리하였다. 외막단백질 부분을 TEAN buffer 에 현탁하여 세척하였다. 분리된 외막단백질의 양은 Bradford법으로 정량하였고, SDS-PAGE를 행하여 coomassie stain으로 염색하여 분석하였다.

## 결 과

### 1. 대상 지역별 분리균주

1999년 5월에서 7월 사이 부산과 서해안 채취 지역에서 *Vibrio*속 분리 결과는 Table 1과 같다. 분리된 120균주의 비브리오 속 중에서 *V. parahaemolyticus*는 70균주가 *V. vulnificus*는 19균주가 분리되었다. 부산 근해인 송정에서는 총 20균주의 비브리오 속 중에서 *V. parahaemolyticus* 6균주가 분리되었으나, *V. vulnificus* 균주는 분리되지 않았고 부산 근해 중 서남해안의 특징을 나타내는 다대포에서는 총 60균주의 비브리오 속 중에서 *V. parahaemolyticus* 36균주와, *V. vulnificus* 14균주가 분리되었다. 대천 지역에서는 총 40균주의 비브리오 속 중에서 *V. parahaemolyticus* 28균주와 *V. vulnificus* 5균주가 분리되었다.

### 2. 중요 생화학적 시험

TCBS 배지에서 녹색의 sucrose 비분해성의 집락을 선택하여 생화학적 특성이 유사한 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*를 분리하기 위한 중요 생화학적 시험을 실시하였다 (Table 2).

모든 19균주의 *V. vulnificus*는 arabinose와 salicin 음성반응을 보였고 lactose와 cellobiose에서는 양성

을 나타냈으며 8% NaCl을 첨가한 배지에서 성장하지 못했다. *V. parahaemolyticus* 분리균주 중 47균주는 arabinose에 양성을 보였고 53균주는 salicin에 음성반응을 나타냈다. 분리된 모든 *V. parahaemolyticus* 균주는 lactose, cellobiose에 음성반응을 나타냈고 8% NaCl을 첨가한 배지에서 53균주가 성장하였다.

### 3. API 20E kit를 이용한 동정

분리된 균주를 API 20E kit로써 동정을 실시하였다 (Table 3). 분리된 균주가 API index에서 *V. vulnificus*의 경우 5046105는 12균주, 5246105는 4균주, 5146105는 3균주의 양상으로 *V. vulnificus*일 확률은 89.4, 93.7, 91.5% 순으로 나타났고 *V. parahaemolyticus*의 경우 4346107는 34균주, 4146116는 28균주, 4346105는 8균주의 양상으로 *V. parahaemolyticus*일 확률은 93.8, 99.9, 93.6% 순으로 나타났다.

### 4. 동정된 분리균주의 특성

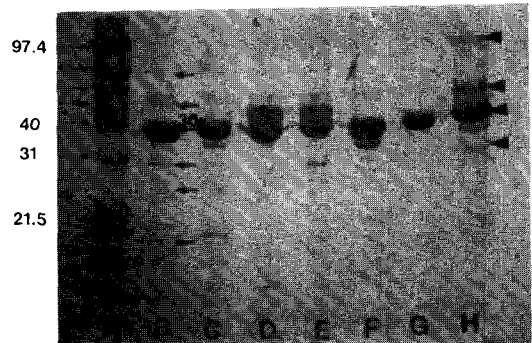
#### 1) 당분해 시험

*V. vulnificus* 분리균주들은 cellobiose, galactose, glucose, maltose, mannose, salicin 및 trehalose, mannitol, lactose 첨가된 배지에서는 산을 생성하였으나, adonitol, arabinose, sorbitol, arabitol, dulcitol, raffinose, rhamnose, sucrose 첨가배지에는 산을 생산하지 않았다

**Table 2.** The Biochemical test results of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* isolates

Test	<i>Vibrio vulnificus</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
	Isolates (n=19)	ATCC 27562	Isolates (n=70)	NIDC serotype 04
Acid production				
Arabinose	0 <sup>a)</sup>	-	47	+
Lactose	19	+	0	-
Cellobiose	19	+	0	-
Salicin	19	+	0	-
8% NaCl	0	-	59	+

a) Number of strains for positive reaction.



**Figure 2.** SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins of *V. vulnificus* isolates.

Lane A: Molecular weight marker (Promega mid range), lane B; *V. vulnificus* ATCC 27562, lane C; *V. vulnificus* 03 strain, lane D-lane G; *V. vulnificus* isolates, lane H; *V. parahaemolyticus*: the bar (→), indicates molecular weights as follows: 97.4 kDa, 66.2 kDa, 55.0 kDa, 42.7 kDa, 40.0 kDa, 31.0 kDa, 21.5 kDa, 14.4 kDa: the bar (→), indicates common protein band of *V. vulnificus*. Estimated molecular weights are as follows; 64, 48, 36, 30, 26, 18 kDa. The symbol (▶), indicates common protein band of *V. parahaemolyticus*.

(Table 4). *V. parahaemolyticus* 분리균주의 47균주는 arabinose 양성, 70균주는 cellobiose, lactose 음성, 53균주는 salicin 음성, 64균주는 rhamnose 음성으로 나타나고 나머지 당분해능은 *V. vulnificus*와 동일하였다.

2) 내염성 시험

*V. vulnificus* 분리균주들은 NaCl을 1%, 3%, 6% 첨

가한 배지에서 모두 성장하였으나 7%에서는 8균주만이 성장했고 8%와 0% 첨가한 배지에서 모두 성장하지 않았다. *V. parahaemolyticus* 분리균주들은 NaCl이 0%인 배지를 제외한 1~7% NaCl을 첨가한 모든 배지에서 성장하였고 8%인 배지에서는 85%인 59 균주가 성장하였다.

**Table 3.** Biochemical characteristics of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* determined by API 20E kit

Test	Score	<i>Vibrio vulnificus</i>				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			
		Isolates			ATCC 27562	Isolates			NIDC serotype 04
		n=12 <sup>c)</sup>	n=4	n=3		n=34	n=28	n=8	
ONPG <sup>d)</sup>	1	+	+	+	+	-	-	-	-
ADH	2	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	4	+	+	+	-	+	+	+	+
ODC	1	-	-	+	-	+	+	+	+
CIT	2	-	+	-	+	+	-	+	+
H <sub>2</sub> S	4	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	1	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	2	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	4	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	1	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	2	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	4	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	1	+	+	+	-	+	+	+	+
INO	2	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	4	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	1	-	-	-	-	-	-	+	-
SAC	2	-	-	-	-	-	-	-	-
MEL	4	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	1	+	+	+	+	-	+	-	+
ARA	2	-	-	-	-	-	+	+	+
OX	4	+	+	+	+	+	+	+	+
Index number		<sup>a)</sup> 5046105 <sup>b)</sup> 89.4%	5246105 -93.7%	5146105 -91.5%	1246005 -99.9%	4346104 -93.8%	4146107 -99.9%	4146116 -99.9%	4346107 -99.9%

a) API count score in index, b) % accuracy, c) Number of strains, d) Abbreviation: ONPG; orthnitrophenyl-β-D-galactosidase, ADH; arginine dehydrogenase, LDC; lysine decarboxylase, ODC; ornithine decarboxylase, CIT; citrate utilization, H<sub>2</sub>S; H<sub>2</sub>S production, URE; urase, TDA; tryptophane deaminase, IND; indole production, VP; Voges-Proskauer, GEL; gelatinase, GLU; glucose utilization, MAN; manitol utilization, INO; inositol utilization, SOR; sorbitol utilization, RHA; rhamnose utilization, SAC; sucrose utilization, AMY; amylase, ARA; arabinose utilization, OX; cytochrome oxidase.

**Table 4.** Carbohydrate fermentation test results of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* isolates

Test	<i>Vibrio vulnificus</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
	Isolates (n=19)	ATCC 27562	Isolates (n=70)	NIDC serotype 04
Adonitol	0 <sup>a)</sup>	-	0	-
Arabinose	0	-	47	+
Arabitol	0	-	0	-
Cellobiose	19	+	0	-
Dulcitol	0	-	0	-
Galactose	19	+	70	+
Glucose	19	+	70	+
Lactose	19	+	0	-
Maltose	19	+	70	+
Mannitol	19	-	70	+
Mannose	19	+	70	+
Raffinose	0	-	0	-
Rhamnose	0	-	6	-
Salicin	19	+	17	-
Sorbitol	0	-	0	-
Sucrose	0	-	0	-
Trehalose	19	+	70	+
Xylose	0	-	0	-

a) Number of strains for positive reaction.

### 3) 외막단백질 pattern 분석

표준균주와 *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* 분리균주들의 외막단백질을 분리하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 표준균주와 분리된 *V. vulnificus*에서 약 36 kDa와 38 kDa의 주요 밴드와 그 외 66, 46, 33, 26 kDa 밴드를 확인하였다 (Fig. 2). 이와는 달리 *V. parahaemolyticus*는 105, 50, 40, 34 kDa의 5~6개의 밴드를 보였다.

## 고 찰

인체 병원성 비브리오 감염은 해양과 인접한 도시와 어촌을 중심으로 생선회와 해산물을 즐겨먹는 사람들에게 흔히 발생하는 것으로 생각되고 있다. 장염 비브리오, 즉 *V. parahaemolyticus*는 1950년

**Table 5.** The NaCl tolerance test of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* isolates

% NaCl	<i>Vibrio vulnificus</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
	Isolates (n=19)	ATCC 27562	Isolates (n=70)	NIDC serotype 04
0	0 <sup>a)</sup>	-	0	-
1	19	+	70	+
3	19	+	70	+
6	19	+	0	+
7	7	-	70	+
8	0	-	59	+

a) Number of strains for positive reaction.

식중독 원인균으로 발견된 되었으며, *V. vulnificus*와 생화학적 성상이 유사하다.

국내의 경우 장염 비브리오는 과거부터 많은 연구자들에 의해 연구되었으며 이후, 주<sup>22)</sup> 등에 의해 한국 남해안 일대의 해산물에서 매년 분리 보고되고 있다.

*V. vulnificus* 감염증은 매년 여름철 특히 우리나라의 경우는 해수 온도가 18.5~26.3°C 사이인 6~10월에 집중적으로 발생한다. *V. vulnificus*는 염도가 비교적 낮은 강 하구에 많이 분포하므로 남, 서해안 지방의 환자 발생률이 동해안 지역 (강원도, 경북, 부산)의 10배가 넘는다고 보고되고 있다<sup>7)</sup>.

본 연구에서는 5월과 7월 사이에 부산의 해안 중에서 빨이 많고 해수온이 높아 서남해안의 특징을 나타내는 다대포 일대와 부산의 동북단에 위치하여 동해안의 특징을 보이는 송정 해수욕장을 선택하였고, 비브리오의 분리율이 비교적 높은 것으로 알려져 있는 서해안 중에서 대천 해수욕장을 선택하여 비브리오 속 특히 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus* 분리를 시도하였다.

*V. vulnificus*를 검출하기 위한 방법으로는 증균배지에 증식시킨 후 선택배지에 도말하여 특징적인 집락을 취하여 각종 생화학 검사를 실시하는 방법이 보편적으로 사용되고 있다. 사용되는 선택배지로는 TCBS 한천배지, SPS 한천배지, VV 한천배지, CPC 한천배지 등이 있다. 그 외에 검출 방법으로는 23s rRNA 유전자에 대한 nested polymerase chain reaction (이하 PCR) 방법이나, cytotoxin -hemolysin 유전자에 대한 PCR 방법 등의 분자생물학적 기법을 이용한 시험 등이 소개되어 있다. 그리고 항혈청

을 사용하는 immunoassay, 표면항원의 구조 분석 등이 소개되고 있다<sup>21)</sup>.

본 실험에서는 선택배지에서 녹색의 특징적인 집락을 취한 후 생화학적 중요 시험과 API 20E kit을 사용하여 균종을 정확하게 동정하고자 하였다. 실험 결과, 송정에서는 총 20균주의 비브리오 속 중에서 *V. parahaemolyticus*가 6균주 (30%) 분리되었고 *V. vulnificus* 균주는 분리되지 않았다. 다대포에서는 총 60 비브리오 속 중에서 *V. parahaemolyticus*가 36균주 (60%), *V. vulnificus* 14균주 (23%)가 분리되었고 서해안 대천 지역에서는 총 40 비브리오 속 중에서 *V. parahaemolyticus*는 28주 (70.0%), *V. vulnificus*는 5주 (12.5%)가 분리되어 상당히 높은 빈도를 나타내었다. 1998년 주<sup>22)</sup> 등이 부산 및 경남 일대의 *V. vulnificus*의 분리율이 10%로 보고한 것 보다 높은 분리율을 나타내었다. 이들 분리율은 해수의 온도와 밀접한 연관성이 있는 것으로써 환경 오염 등으로 인한 해수온의 상승은 병원성 비브리오의 분리율을 계속하여 상승시킬 것으로 사료되었다. 송정 지역의 낮은 분리율은 6월의 장마에 따른 수온의 하강에 의한 것으로 사료되었다. 그리고 대천과 다대포 지역에서 높은 분리율은 높은 수온과 인근 지역의 많은 유기물 유입에 따른 것으로 사료되었다.

해수에서의 *V. parahaemolyticus* 분리율은 73.3%로 높았고 *V. vulnificus*는 해수와 해산물에서 26.6%의 높은 분리율을 보여 이 지역의 해산물 섭취와 보관 시 철저한 위생적 처리 방법이 요구될 것으로 사료되었다.

생화학적인 성상이 비슷한 *V. vulnificus*와 *V. parahaemolyticus*를 동정하는데 사용되는 중요한 5가지 생화학적 시험에서 *V. vulnificus*는 lactose, cellobiose 분해능에서 양성과 salicin, arabinose 음성반응을 보이고 8% NaCl에서 성장하지 않았다. *V. parahaemolyticus*는 47균주가 arabinose 양성반응을 나타냈고 70균주가 lactose, cellobiose 음성반응을 보였으며, 53균주는 salicin 음성반응을 보였다. 그리고 8% NaCl을 첨가한 배지에서 성장률은 84%를 나타냈다.

동정의 정확성을 위해 API 20E kit를 사용하였는데, 분리된 *V. vulnificus* 12균주가 5046105, 4균주가 5246105, 3균주가 5146105로 나타났고 정확성은 표준균주 99.9%에 비해 낮은 수치였다. 분리된 *V. parahaemolyticus* 70균주 중 34균주가 4346104, 28균주가 4146107, 8균주가 4146116로 나타났고 동정률은 93.8%, 99.9%, 99.9% 순으로 나타났다.

동정된 균주들의 당분해 시험 결과는 표준균주와

유사한 양상을 보였는데, *V. vulnificus* 분리균주들은 표준균주와 달리 모든 균주가 mannitol을 분해하였다. 지금까지 보고에서는 *V. vulnificus*의 manitol 분해능은 약 50% 정도로 보고된 것에 비해, 금번 시험에서는 모든 균주가 manitol을 분해하여 다른 성상을 나타내었다.

호염성 시험에서 *V. vulnificus*는 7% NaCl을 첨가한 배지에서는 8균주만이 성장했고 8% NaCl을 첨가한 배지에는 성장하지 못했다. 따라서 *V. vulnificus*가 성장할 수 있는 염분농도는 1~7%인 것으로 생각되었다. *V. parahaemolyticus*는 1~7% NaCl을 첨가한 배지에서 성장하였고 8% NaCl을 첨가한 배지에서는 분리균주의 84%가 성장하였다.

*V. vulnificus* 해양 분리균주의 정확한 동정을 위해 OMP를 분리하여 SDS-PAGE 전기영동한 profile의 비교 분석에 의하면 *V. vulnificus*에는 약 36 kDa의 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었고 66, 46, 33, 26 kDa의 여러 공통밴드를 확인할 수 있었다. 이와 대조적으로 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 105, 50, 40, 34 kDa 등의 뚜렷한 주요 외막단백질을 가지고 있지 않고 5~6개의 OMP 밴드를 가져 *V. vulnificus*와 다른 양상을 보였다. 본 시험은 생화학적 시험으로 일차 동정된 균주에 대하여 실시하여 그 차이점을 확실하게 알 수 있었다. 그러나 동정의 초기부터 적용하여 사용하기에는 적합하지 않을 것으로 사료되었으며, 종 특이적인 외막단백질을 분리, 정제하여 이에 대한 항체로서 균주의 분리 및 동정에 이용할 수 있을 것으로 사료되어졌다.

균종을 동정, 검출한다고 하는 것은 간단하고 쉬운 것은 아니며, 한가지 실험 방법과 결과로 확증할 수 없다고 사료되었다. 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로 신속하고 정확한 동정을 위해 계속하여 항원 특이성이 높은 항혈청을 개발하거나 종 특이 표면항원에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) 주진우, 김일: 한국 남해안 일대의 해수 및 해산물에서 *V. vulnificus*의 분리연구. 대한미생물학회지 **21**: 97-106, 1986.
- 2) 주진우, 이미현, 김일: 한국 울릉도 근해의 비브리오 속의 분리연구. 대한미생물학회지 **21**: 345-353, 1986.
- 3) 주진우: 한국 남해안 일대의 해수 및 해산물에

- 서 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Vibrio vulnificus*의 분리연구. 부산대학교 자연과학논문집 **42**: 203-212, 1986.
- 4) 주진우, 김일: *Vibrio damsela*의 분리연구. 대한미생물학회지 **22**: 225-232, 1987.
  - 5) 주진우, 김일: *Vibrio vulnificus*에 관한 연구-한국 동, 남해안 일대의 해수 및 해산물에서 *V. vulnificus*의 분리-부산대학교 자연과학논문집 **40**: 215-226, 1985.
  - 6) 주진우, 이미현: 한국 남해안 일대의 장염 비브리오 분포에 관한 연구-부산, 마산, 충무 및 울산 근해의 해수, 해니 및 각종 해산물에서 장염 비브리오 분리-부산대학교 자연과학논문집 **41**: 191-204, 1986.
  - 7) 신명근, 신종희, 양동욱: *Vibrio vulnificus* 감염증의 임상적 고찰. 대한임상병리학회지 **13**: 287-293, 1993.
  - 8) Baumann P, Schubert RHW: Family II *Vibrionacea*, p. 516-550. In kreig NR and Holt JG (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* volum 1. The Williams and wilkins CO., Baltimore, 1984.
  - 9) Blake PA: Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J Infect Dis* **149**: 558-561, 1984.
  - 10) Bowdre JH, Poole MD, Oliver JD: Edema and heconcentration in mice experimentally infected with *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **32**: 1193-1199, 1981.
  - 11) Chung SS, Park CH, Rhee JH: Study on the bacteriological propeties of *Vibrio vulnificus*. *Korean J Infect Dis* **18**: 55-62, 1986.
  - 12) Chung Y, Park MY, Lee SY, Kim KS, Lee SI: *Vibrio vulnificus* septicemia in patient with liver cirrhosis. *Yonsei Med J* **23**: 146-152, 1982.
  - 13) Farmer JJ III: Revival of the name *Vibrio vulnificus*. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 656, 1980.
  - 14) Farmer JJ III: *Vibrio (Benekaea) vulnificus* the bacterium associated with species, septicemia, and the sea. *Lancet* **2**: 903, 1979.
  - 15) Filip C, Fletcher CG, Wulff JL, Earhart CF: Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent: sodium lauroyl sarcosinate. *J Bacteriol* **15**: 171-177, 1973.
  - 16) Goo JS, Kim DW, Han KS, Suk JS, Park MH, Kim SI: Lactose fermenting *Vibrio (Vibrio vulnificus)* septicemia-report of fire cases. *Korean J Clin Path* **16**: 463-469, 1982.
  - 17) Hlady WG, Mullen RC, Hepkin RS: *Vibrio vulnificus* from raw oysters. Leading cause of reported deaths from foodborne illness in Florida. *J Florida Med Assoc* **80**: 536-538, 1993.
  - 18) Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, et al.: Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* **3**: 425-431, 1976.
  - 19) Hur MK: Report of case of *Vibrio vulnificus* isolated from wound infection Korean. *J Clin Path* **6**: 69-75, 1986.
  - 20) Johnson DE, Calia FM: Hemolytic reaction of clinical and environmental strain of *Vibrio vulnificus*. *J Clin Microbiol* **14**: 457-459, 1979.
  - 21) Ju JW, Kim KS, Hoe MS, Jung CR: Isolation of Detection of *Vibrio vulnificus* from the Southern Sea of Korea for the prevention of *V. vulnificus* Infection. *J Korean Soc Microbiol* **33**: 361-371, 1998.
  - 22) Ju JW, Kim KS, Park SJ, Yoon SO, Jung CR: Identification of *Vibrio vulnificus* in Pusan and Southern Sea of Korea in 1996 using API 20E kit. *J Korean Soc Microbiol* **33**: 187-194, 1998.
  - 23) Kim JJ, Yoon KJ, Yoon HS, Chong Y, Lee SY, Chon CY, Park IS: *Vibrio vulnificus* septicemia: Report of four cases. *Yonsei Med J* **27**: 307-313, 1986.
  - 24) Tison DL, Kelly MT: *Vibrio vulnificus* endometritis. *J Clin Microbiol* **30**: 185-186, 1984.
  - 25) Yang HC, Hong SS, Kim KH, Choi SH, Chung HJ: Distribution of *Vibrio vulnificus* in Chonnam Coastal Area. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **27**: 70-74, 1999.