

용혈독소를 생산하는 기수성 비브리오균의 생리·생태적 특성과 수산식품의 위생 대책

1. 용혈독소를 생산하는 새로운 병원성 *Vibrio* sp.의 분리와 동정

김영만 · 최길배 · 장동석*
동의대학교 식품영양학과 · *부경대학교 식품공학과

Physiological and Ecological Characteristics of Hemolytic Vibrios and Development of Sanitary Countermeasure of Raw Fisheries Foods

1. Isolation and Identification of Novel Pathogenic *Vibrio* sp. Producing Hemolysin

Young-Man KIM, Gil-Bae CHOI and Dong-Suck CHANG*

Department of Food Science and Nutrition, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea

*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

To determine the physiological, biochemical characteristics and toxicity of hemolysin produced by a novel sucrose positive *Vibrio* (*Vibrio* sp. D5) isolated from estuary of Kum river, it was compared with already known sucrose positive *Vibrio*. Salinity, pH, temperature and conductivity of place where *Vibrio* sp. D5 was isolated were 4.7‰, 7.6, 24°C and 7800µMHOS, respectively. Physiological and biochemical characteristics distinguished *Vibrio* sp. D5 from other sucrose positive *Vibrio*: *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* and *V. metschnikovii*. The range of salinity and pH for growth of *Vibrio* sp. D5 were 0.5%~7.5% and 4.5~9.5, respectively. *Vibrio* sp. D5 exhibited typical yellow colony on TCBS agar plate and curved rod type upon transmission electron microscopy (TEM). *Vibrio* sp. D5 had lethal toxicity against mouse in case of intraperitoneal injection with its culture and showed hemolysin activity on human blood agar and sheep blood agar. *Vibrio* sp. D5 also demonstrated vascular permeability activity toward rat.

From the above results, *Vibrio* sp. D5 was ascertained to be a novel pathogenic *Vibrio*.

Key words : *Vibrio* sp. ecology, novel pathogenic *Vibrio* sp.

서 론

Vibrio 속은 담수에서 해수까지 넓은 수역에서 검출되는 세균으로서 현재 44종이 알려져 있으며 (Holt et al., 1994) 앞으로도 그 수는 증가할 것으로 예상된다.

사람의 건강과 관련된 병원성 *Vibrio*균은 *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*가 있으며 (Holt et al., 1994), 특히 *V. cholerae* non-01 (Non-agglutinable *Vibrio cholerae*), *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* 4종을 일본 후생성에서는 식중독 원인균으로 지정하였다 (Miyoshi, 1989).

우리 나라 서해안과 강 하구에서 빈번히 문제가 되는 병원성 *Vibrio*는 기수(氣水) 영역에서 주로 검출되는 *V. cholerae* non-01, *V. mimicus* 및 *V. vulnificus*가 있으며, 이들 균은 단일 감염으로 발병하는 경우도 있으나 상당히 많은 식중독 사례에서 혼합 감염이 되는 것으로 알려지고 있다 (Chang et al., 1993). 이런 균들의 생태를 연구하는 과정에서 이들과 다른 생화학적 특성을 나타내면서

Vibrio 속으로 추정되는 균들이 발견되는 경우가 있었다. 그리고 수산물의 생식으로 인한 장염환자의 원인균 구명 과정에서 병원성 *Vibrio* 속이 2종 이상 검출되는 경우가 있는가 하면 분명히 *Vibrio* 속의 특성을 갖고 있으면서 기존에 알려진 병원성 *Vibrio* 속과 다른 생화학적 특성을 나타내는 균도 있었다. 결국 이런 균들은 학계에 보고되어 있지 않은 새로운 병원성 *Vibrio* 속이라고 추정되는바 본 연구자들은 바다와 하천이 합류되어 다른 지역 보다 염도가 낮고 수심이 얕으며 썩이 많고 유기물질의 유입이 많아서 영양물질이 풍부하여 저염성 *Vibrio*가 서식하기 좋은 조건을 갖추었다고 알려진 금강 하구 지역 (Kim et al., 1987; Chang et al., 1993; 1995)을 대상으로 시료를 채취하여 새로운 병원성 *Vibrio* 속을 분리 동정하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균의 분리와 동정

균의 분리와 동정은 Fig. 1과 같이 실시하였다. 해수를

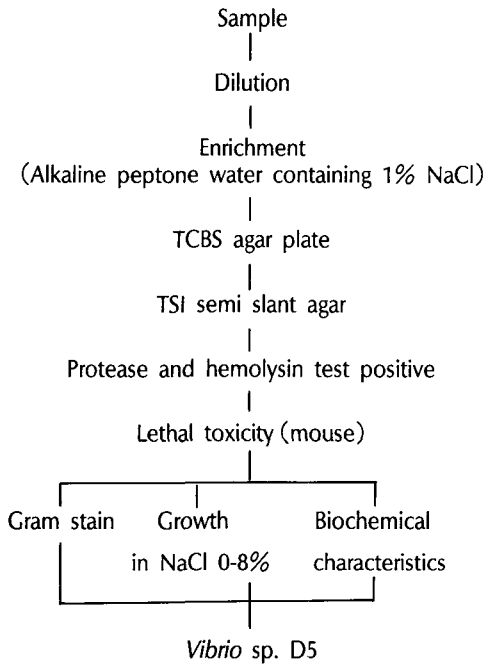


Fig. 1. Schematic diagram for isolation of *Vibrio* sp. D5.

희석하여 1% NaCl을 가한 alkaline peptone water에 접종하고 37 ± 1°C에서 16~18시간 증균배양하였다. 증균배지에서 양성으로 나타난 시험관의 균액은 TCBS (thiosulfate-citrate-bile-salt-sucrose, Difco Co., USA) 평판배지에 희석배양하여 전형적인 황색 집락을 형성하는 것을 분리한 후, TSI (triple sugar iron Difco Co., USA) 반사면 배지에 접종하여 가스 생성이 없고 전형적인 반응을 나타내는 균을 Harrigan and McCance (1976)법에 의하여 protease와 hemolysin 양성인 균주를 선택하여 새양쥐에 복강주사하고 치사독성이 확인된 균주를 선정하였다. 선정된 균은 미국 FAD 표준방법 (1992)과 Holt et al. (1994)의 분류법에 준하여 동정하였다.

2. 치사독성 측정

Vibrio sp. D5를 식염 1%를 가한 BHI (brain heart infusion, Difco Co., USA) 배지에서 37°C, 16시간 배양한 균액 1 ml를 ICR (institute cancer research)계 새양쥐 (18~20g, 수컷) 5~10 마리에 복강주사하여 24시간 이후에 사망 여부를 확인하였다.

3. 해수 수질 분석

염도와 conductivity는 현장에서 conductivity meter (YSI Co., Japan)로 수심 1m 부분을 측정하였다.

pH 측정은 시료 채취장소에서 pH Bol-C1 (Shindegen Co., SU-08, Japan)로 측정하였다.

Chemical oxygen demand (COD) 측정은 AOAC (1990)의 방법에 준하여 실시 하였다.

4. 생육한계 염도와 pH 측정

생육한계 염도 측정은 peptone water에 NaCl을 0~8.5%로 조절하고, 생육한계 pH 측정은 NaCl 1%를 가한 peptone water에 pH를 4.0~10.0으로 조절하여 각각 *Vibrio* sp. D5를 한백금이 씌 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 균의 증식 여부를 확인하였다.

5. 균의 형태 분석

전자현미경 촬영은 부산 인제대학교 부속 백병원의 전자현미경실 (Transmission Electron Microscope, JEM 1200 EX-II, jeol, Japan)에서 실시 하였다.

6. 용혈성 시험

BHI 배지에 16시간 배양한 배지를 1% Human blood agar plate와 1% Sheep blood agar plate에 streak하여 37°C에서 24시간 배양한 후 투명환이 생성되는 것을 비교, 확인하였다.

7. 피부혈관투과 항진성 실험

BHI 배지에 16시간 배양한 배양액을 Wistar계 rat의 등 피부 내에 주사하고 6시간 방치한 후 등피부를 잘라서 혈관투과항진에 따른 spot을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 균이 분리된 장소의 환경조건

균이 분리된 장소는 금강 하구댐 밑이며 썰물이 시작되어 바닷물이 빠지고 강물의 유입이 시작되는 시간이므로 염도는 4.7‰로 낮은 편이었으며 pH는 7.6으로 보통의 해수보다 약간 낮은 편이었다. COD는 1.9 ppm으로 유기물질의 농도는 금강 하구물의 평균 수준이었고 (Table 1), 수온은 24°C로 비교적 염도가 낮은 조건에서 주로 검출되는 *V. cholerae* non-01, *V. mimicus* 및 *V. vulnificus*의 서식 조건으로는 좋은 환경이라고 사료된다. 그러므로 분리된 균은 기수 영역에서 주로 출현할 수 있는 생태학적 특성을 갖고 있다고 사료된다.

2. 생화학적 특성

Bergey's manual of determinative bacteriology 9판

Table 1. Environmental conditions of the estuary of Kum river where *Vibrio* sp. D5 was isolated

Tested items	Result
Date	19 th Jun. 1993.
Time	17 : 00
Source	Water
Temperature	24°C
Salinity	4.7‰
Conductivity	7800µMHOS
pH	7.6
COD (mg/ℓ)	1.9

(Holt et al., 1994)에 수록된 병원성 *Vibrio* 12종 중에 TCBS 평판배지에서 황색 집락을 형성하는 6종과 본 실험에서 분리한 균의 생화학적 특성 (Table 2)을 비교하여 보면 *V. alginolyticus*와는 citrate, arginine dihydrolase, gelatin분해, arabinose, lactose, salicin, oxidase 시험 및 VP 시험 결과와 8% 식염 내성에서 다른 반응을 보였다. *V. cholerae*와 비교하면 식염내성 시험에서 0%, 6% 및 8%

에서 다른 반응을 보여 분명히 구별되었으며 ONPG, oxidase, indole생성, arginine dihydrolase, gelatin 분해, arabinose, lactose, salicin 반응에서 다르게 나타났다.

*V. cincinnatiensis*는 oxidase, ONPG, citrate, arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase, cellobiose 및 lactose 시험에서 다른 반응을 나타내었다. *V. fluvialis*와 *V. furnissii*경우는 lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, gelatin 분해, lactose, salicin 시험에서 다른 반응을 나타내었다. *V. metschnikovii*의 경우는 V-P 시험, ornithine decarboxylase, arabinose 및 salicin 시험에서 반응이 다르게 나타났다 (Table 2).

이상의 결과로 볼 때 *Vibrio* sp. D5는 기존에 알려진 sucrose 분해능이 있는 병원성 *Vibrio*들과는 다른 균으로서 아직 알려지지 않은 신종이라고 사료되어진다. 그러나 정식 확명을 부여 하기에는 좀 더 많은 연구가 있어야 될 것으로 생각되어 편의상 *Vibrio* sp. D5로 명명하였다.

3. 생육에 대한 염도의 영향

*Vibrio*속을 분류하는데 생육 가능한 염도 범위가 중요

Table 2. Comparison of biochemical characteristics of the isolated *Vibrio* sp. D5 with the other sucrose positive *Vibrios* which gave hemolytic activity

Tested items	<i>Vibrio</i> sp. D5	VA	VC	VCi	VF	VFu	VM
Growth in:							
0% NaCl	-	-	+	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	±	+	+	+	+
8% NaCl	±	+	-	+	±	+	±
Acid from							
Salicin	+	-	-	+	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	-	-	-	-	±
Cellobiose	-	-	-	+	±	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	-	-	+	+	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+
V-P test	-	+	±	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	+	-	-	-	+	+	±
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	-	-	+
Ornithine decarboxylase	+	±	+	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	+	+	-	+	+	±
Indole production	-	+	+	-	-	-	-
Methyl red	+	±	+	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	+	+	±	±	±
Oxidase	-	+	+	+	+	+	±
Citrate	+	-	+	-	+	+	±

+, positive ; -, negative ; ±, 11~89% of strains are positive; VA, *V. alginolyticus* ; VC, *V. cholerae* ; VCi, *V. cincinnatiensis* ; VF, *V. fluvialis* ; VFu, *V. furnissii* ; VM, *V. metschnikovii*

Table 3. Salt tolerance of *Vibrio* sp. D5 incubated in peptone water at 37°C for 24 hours

Tested tubes	Salinity								
	0%	0.5%	1.0%	3.0%	6.5%	7.0%	7.5%	8.0%	8.5
A	-	+	++	++	++	+	+	±	-
B	-	+	++	++	++	+	+	±	-
C	-	+	++	++	++	+	+	±	-
D	-	+	++	++	++	+	+	±	-
E	-	+	++	++	++	+	+	±	-

++, +, Growth ; ± Weak growth ; -, No growth

Table 4. Effect of pH on *Vibrio* sp. D5 incubated in peptone water at 37°C for 24 hours

Tested tubes	pH							
	4.0	4.5	5.0	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
A	-	-	+	++	++	+	±	-
B	-	+	+	++	++	+	±	-
C	-	+	+	++	++	+	±	-
D	-	-	+	++	++	+	±	-
E	-	-	+	++	++	+	±	-

++, +, Growth ; ± Weak growth ; -, No growth

한 분류 항목이 되므로 *Vibrio* sp. D5의 생육 가능한 염도 범위를 실험한 결과는 Table 3과 같다.

Peptone water에 식염을 0%~8.5%까지 첨가하여 24시간 배양한 결과 식염이 첨가되지 않았을 경우는 증식이 전혀되지 않았으며 식염 0.5%를 첨가한 경우는 미약한 증식이 육안으로 확인되었고, 식염 1.0~6.5%까지 첨가하였을 때는 증식이 양호하였다. 식염 7.0과 7.5% 첨가된 경우는 주의깊게 관찰했을 때 육안으로 증식이 확인되는 정도이었고 8.0% 첨가된 경우는 거의 증식이 되지 않았으나 주의 깊게 관찰하면 약간의 균을 확인할 수 있는 정도였다. 병원성 *Vibrio* 중에 *V. alginolyticus*나 *V. parahaemolyticus*의 경우는 염도가 8% 이상에서 증식이 가능하고 주로 해수에서 검출되는 반면 *V. cholerae*와 *V. mimicus*는 염분이 전혀없는 상태에서 증식이 가능한 것으로 볼 때 *Vibrio* sp. D5와는 구분이 된다. 그러나 기수성 *Vibrio*이면서 병원성이 있는 *V. fluvialis*, *V. damsela*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*와 생육이 가능한 염도 범위가 같은 것으로 볼 때 (Krieg and Holt, 1984), *Vibrio* sp. D5도 기수성 세균으로 사료된다.

4. 생육에 대한 pH의 영향

Vibrio 속은 비교적 높은 pH에서 증식이 가능한 것으로 알려져 있으며 특히 기수성 *Vibrio* 중에서 가장 문제시 되고 있는 *V. vulnificus*는 pH 5~10까지 증식이 가능하고 pH 8에서 가장 증식이 잘 된다고 알려져 있다 (Chang

et al., 1993). *Vibrio* sp. D5의 증식 가능한 pH 범위는 1% 식염을 첨가한 peptone water에서 pH 4.5일 때는 발육이 미약하고 pH 5.0~9.0 사이에서 증식이 가능하며 pH 9.5 이상이 되면 발육에 지장을 받는 것으로 나타났다 (Table 4). 그리고 pH 8.0과 8.5에서 가장 잘 증식하는 것으로 볼 때 전형적인 *Vibrio* 속의 특성을 나타내었다.

5. TCBS 한천평판배지에서 집락의 형태

TCBS 한천평판배지에서 집락의 형태는 전형적으로 sucrose를 분해하는 *Vibrio* 속의 형태를 나타내었다. 18시간 배양한 집락의 크기는 3~4 mm, 질 (consistency)은 활면형 (smooth), 형태 (form)는 원형 (circular), 고도 (elevation)는 융기 (convex)된 형태, 가장자리 (edge)는 둥근모양 (entire)을 나타내었고 *V. alginolyticus*보다는 약간 작고 *V. cholerae* non-01과 유사한 집락이었다.

6. 균의 형태

Gram 음성의 전형적인 간균이었으며 *Vibrio* 속의 특징인 콤마 형태로 나타나는 균이 절대 다수를 차지하여 전자현미경으로 확인한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 약간 구부러진 형태를 나타내었다. 이는 *Vibrio* 속 세균의 전형적인 형태이다.

7. 병원성의 확인

균을 분리할 때 새양쥐에 대한 치사 독성이 확실한 균



Fig. 2. Transmission Electron micrograph of *Vibrio* sp. D5.

주를 선택하였기 때문에 기본적으로 병원성은 있다고 인정된다. 병원성 *Vibrio*의 주 병원성인자로 알려져 있는 hemolysin의 용혈성을 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 일반적으로 사용되는 사람혈액한천배지와 면양혈액한천배지에서 용혈성이 확실히 나타나는 것으로 보아 hemolysin의 생산이 확인되었다. 그리고 hemolysin을 생성하는 균주는 피부혈관투과성 항진작용이 있는 것으로 알려져 있어서 rat의 등피부내에 균 배양액을 투여한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 혈장알부민의 누출이 확인되었다. 이와같은 결과로 볼 때 *Vibrio* sp. D5는 병원성이 확실할

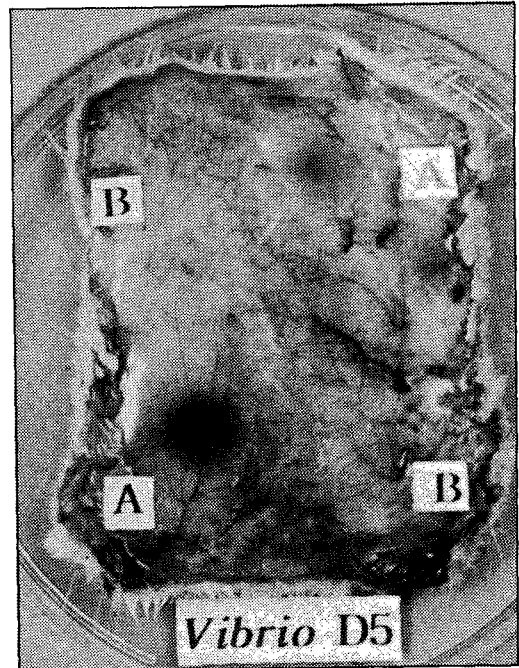


Fig. 4. Vascular permeability activity *Vibrio* sp. D5. The dermal surface of a rat on 6 hours after intradermal injection.
A : 0.1 ml of mid-logarithmic-phase *Vibrio* sp. D5 incubated in BHI broth.
B : Control (0.1 ml BHI broth).

것으로 사료된다.

요 약

금강 하구의 물에서 분리된 sucrose 분해성 *Vibrio* 속 중에 용혈독소를 생산하는 균주의 독성을 시험한 결과와

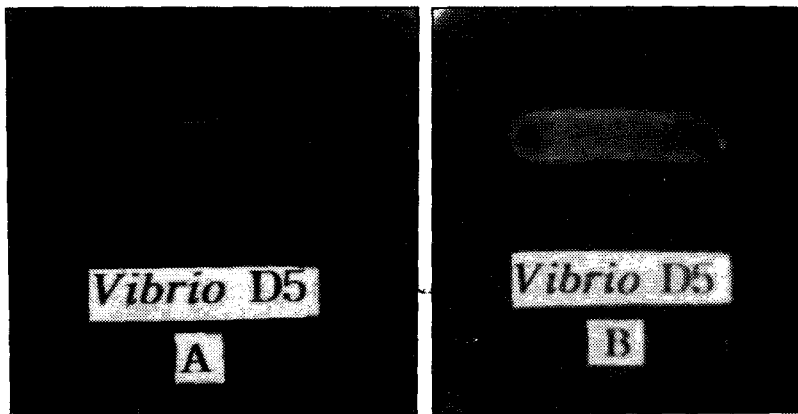


Fig. 3. Hemolysin activity of *Vibrio* sp. D5 on human blood agar plate (A) and sheep blood agar plate (B).

기준에 알려진 12종의 병원성 *Vibrio* 속과 비교한 결과는 다음과 같다.

1. 분리된 장소의 환경조건은 염도가 4.7‰, pH가 7.6, 수온이 24°C 및 conductivity가 7800µMHOS이었다.

2. 생리, 생화학적 특성과 염분 요구도를 비교한 결과 sucrose를 분해하는 병원성 *Vibrio*인 *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* 및 *V. metschnikovii*와는 확실히 구별되었다.

3. 생육가능한 염도는 0.5~7.5‰이었으며 생육가능한 pH는 4.5~9.5이었다.

4. TCBS 평판한천배지에서 균의 집락은 전형적인 황색집락이었으며, 전자현미경에 나타난 균의 형태은 콤팩트 상 간균이었다.

5. 새알쥐에 대한 치사독성이 확실하였으며, 사람과 면양 적혈구에 대한 용혈성이 확인되었고 rat 피부혈관 투과성 항진작용이 양성이었다.

이상의 결과로 이 균은 병원성이 확인되었고 기준에 알려지지 않은 *Vibrio* 속으로 확인되어 이 균을 *Vibrio* sp. D5로 명명하였다.

감사의 글

이 논문은 95년도 한국과학재단의 특정연구과제(95-0402-06-01-3)로 연구 되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists.

Vol. I. Kenneth Helrich ed. 15th., Arlington Virginia, U.S.A. pp. 316~317.

Chang, D. S., Y. M. Kim, W. Y. Park, H. K. Seong, H. S. Yu, S. M. Kim and Y. M. Kim. 1993. Study on the Pollution of Fish Products by *Vibrio* sp. The National Fish. Univ. of Pusan. Lab. of Food Microbiology. pp. 1~11, 30~36 (in Korean).

Chang, S. H., D. J. Song, S. J. Yang, I. S. Shin and Y. M. Kim. 1995. Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Vibrio mimicus* in Estuary of Kum River, Korea. Bull. Korean Fish. Soc. 28 (1), 15~22 (in Korean).

FDA. 1992. Bacteriological Analytical Manual 7th ed. Department of Health Education and Welfare. Food and Drug Administration U.S.A. pp. 11~138.

Harrigen, M. F. and M. E. McCance. 1976. Biochemical Tests for Bacteria in Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, New York, pp. 67~68, 81.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition Williams & Wilkins, U.S.A. pp. 273~274.

Kim, Y. M., I. S. Shin and D. S. Chang. 1987. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Coast of South Korea. Bull. Korean Fish. Soc. 20 (6), 591~600 (in Korean).

Krieg, N. R. and J. R. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A. pp. 516~550.

Miyoshi, S. 1989. Infection of *Vibrio* sp. J. Antibact. Antifung. 17, 279~285.

1996년 8월 21일 접수

1997년 5월 6일 수리