

## 군산인근해역에서 분리동정된 *Vibrio* 속의 특성과 해수에서의 생존

왕 해 영 · 이 건 형\*

(군산대학교 자연과학대학 생명과학과)

**적 요** - 1997년 11월부터 1998년 6월까지 총 4회에 걸쳐 군산인근 해역을 대상으로 *Vibrio* 속의 분포와 특성을 조사하였고, 분리동정된 *Vibrio* 속 3종(*V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*)을 대상으로 해수에서 수온 변화에 따른 생존을 관찰하였다. 조사 기간 중 총 해양 종속영양 세균의 분포는 평판도말법으로는  $1.2 \pm 0.6 \times 10^3 \sim 2.0 \pm 1.5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>을 나타냈으며, 형광현미경에 의한 직접추정법으로는  $6.0 \pm 4.0 \times 10^5 \sim 1.9 \pm 1.5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>의 범주에서 변화하여 추정방법에 따라 커다란 차이를 보였다. 해양 *Vibrio*의 분포는  $1 \times 10 \sim 6 \pm 2.2 \times 10^2$  CFU ml<sup>-1</sup>의 범주에서 변화하여 전반적으로 총 해양 종속영양 세균의 수에 대하여 차지하는 비율은 0.1~6%였다. 최종 분리된 51균주를 Biolog Identification System™에 의해서 동정한 결과 *V. mediterranei* (11균주), *V. anguillarum* (13균주), *V. metschnikovii* (5균주), *V. parahaemolyticus* (5균주) 등이 우점속으로 밝혀졌다. 분리 동정된 51균주들 간의 통계학적 유사도를 70% 이상을 기준으로 grouping한 결과 26 group으로 나뉘어 본 조사해역에서 *Vibrio* 속의 다양성을 간접적으로 보여 주고 있다. 동정된 균주들에서 plasmid의 존재를 확인한 결과 65%에 해당하는 33균주가 plasmid를 갖고 있었으며 그 크기는 12 kb 이상으로 나타났다. 또한 분리된 51균주들에 대하여 7종의 항생제(gentamicin, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, kanamycin, tetracycline, carbenicillin)에 대한 내성을 측정한 결과 51균주들 중 96%가 한 종류 이상의 항생제에 대하여 내성을 나타냈다. 분리 동정된 균주들 중 *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*를 대상으로 여과된 해수에 접종시켜 생존율을 4, 15, 25°C에서 30일간 측정한 결과 15°C에서 가장 높은 생존율을 보였다.

### 서 론

*Vibrio* 속은 그람 음성의 호염성 균으로서 해양 퇴적토와 해수에 주로 분포하며 일반적으로 해양생물, 특히, 어패류에서 많이 발견되는 진형적인 해양 세균으로 알려져 있다(Bartley & Slanetz 1971; Kampelmacher *et al.* 1972; Kaneko & Colwell 1973; Krieg & Holt 1984; Liston & Baross 1973). *Vibrio* 속에 속하는 종은 현재까지 44종이 동정되었고, 이 중에서 사람에게서 분리되는 것만도 12종이 알려져 있다(Bauman 1980; Farmer 1985). 이들 *Vibrio* 속 중 해양에서 발견되는 대부분의 종은 사람에게 병원성을 나타내며, 그 중 몇몇 종은 감염되면 치명적인 것으로 알려져 있다(Blake *et al.* 1981; Chan *et al.* 1986). 해양 *Vibrio* 속은 어패류 또는 해수에 상존하면서 특히 여름철에 적절한 수온과 pH, 그리고 유기물에 의해 균체수가 증가하여(Kasper & Templin

1993; Kelly 1982) 이들이 감염된 어패류를 날로 먹거나 상처난 피부를 해수에 노출할 경우에 Vibriosis라는 질병을 유발시킬 수 있다. 이로 인해 여름철에는 매년 수십 명의 인명피해가 보고되고 있을 뿐만 아니라 해산물의 소비도 급감하여 어민들에게 경제적 손실을 초래하기도 한다. 더욱이 간질환을 갖고 있거나 알콜에 중독된 사람들에게는 *Vibrio* 균의 감염은 치명적이어서 이 질병의 발병 경로 추적과 예방법은 공중보건학상으로도 많은 관심을 기울이는 분야이다. 우리 나라 서해안은 수심이 낮고 수온이 동해나 남해에 비해 높아 *Vibrio* 균에 의한 질병의 발생률이 높으며, 매년 그 발생률도 증가하는 추세이다.

해양환경에서 *Vibrio* 속에 관한 연구는 국내의 경우, *Vibrio* 속의 분리동정에 관한 연구로, 주로 사람에게 치명적인 피해를 주는 *Vibrio vulnificus*에 관한 연구들(김과 김 1985; 박과 김 1986; 이 1990b; 정 등 1987)이며, 우리 나라 연안에서의 *Vibrio* 속의 분포와 특성(송

\*교신저자 email: ghlee@kunsan.ac.kr

등 1984, 1985; 이 등 1984)에 관련된 연구는 비교적 적으며 *Vibrio* 속의 생존에 관한 연구는 국내외적으로도 비교적 드문 편이다.

본 연구에서는 군산인근해역을 대상으로 1997년 겨울부터 1998년 여름까지 4회에 걸쳐 군산인근해역에서 *Vibrio* 속을 분리 동정하여 특성을 조사하였고, 또한 동정된 *Vibrio* 속 중 3종(*V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*)을 선택하여 해수에서의 생존을 측정하였다.

이러한 연구는 서해 연안생태계에서 *Vibrio* 속의 동태와 해수의 수온변화에 따른 *Vibrio* 속의 생존상태를 파악함으로써 *Vibrio* 속에 의해 유발될 수 있는 질병을 예방할 수 있는 생태학적 및 보건위생학적인 기초자료로 활용될 수 있으리라 기대한다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구수역 및 시료 채취방법

본 연구는 군산 인근해역의 6개 정점을 대상으로 표층수와 저층수에서 1997년 11월부터 1998년 6월까지 4회에 걸쳐 채수하였다(Fig. 1).

해수 시료의 채수는 Niskin 채수기를 사용하였으며, 표층수 시료는 표층에서 수심 50 cm 사이에서, 저층수 시료는 저층에서 1 m 위쪽에서 채수하였다. 각각 채수된 시료는 멸균된 cap-tube에 담아 0°C를 유지하는 Ice-box로 실험실로 운반하여 즉시 분석하였다.

### 2. 총세균 및 *Vibrio* 균체수의 측정

각 정점의 표층수 및 저층수에 분포하는 종속영양세균(heterotrophic bacteria)의 균체수는 멸균된 해수로 희석하여 Bacto-marine agar 2216 (Difco)에 도말한 후  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 7일간 배양하여 나타난 균체수를 계수하였다. 세균의 최종 개체군 밀도(population density)는 colony-forming units (CFU)  $\text{ml}^{-1}$  단위로 환산하였다. 한편, 직접측정법(Acridine orange direct count: AODC)은 formalin으로 현장에서 고정시킨 시료 중 1 ml를 취하여 Sudan black B(Merck)로 미리 염색된 polycarbonate membrane filter (Nuclepore Co., 25 mm  $\phi$ , 0.2  $\mu\text{m}$  pore size)에 여과한 후 1% acridine orange(Merck) 용액 1 ml를 가해 filter가 완전히 잠기게 하여 5분간 염색한 후 여과하였다. 염색된 filter는 공기 중에서 건조시켜 형광현미경(Ernst Wetzlar GMBH, DIAPLAN 2,500 $\times$ )으로 관찰하여 Rodina(1972)에 의한 식으로 계산하였다. 해양 *Vibrio* 속의 균체수는 Bacto-TCBS (Thiosulfate-citrate-bile-sucrose) agar (Difco)에서 37°C로 2일간 배

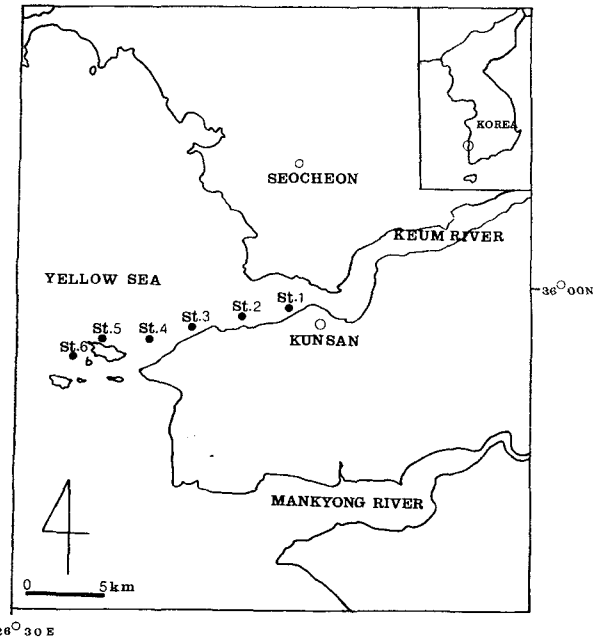


Fig. 1. Sampling stations near Kunsan of the Yellow Sea during November, 1997 and June, 1998.

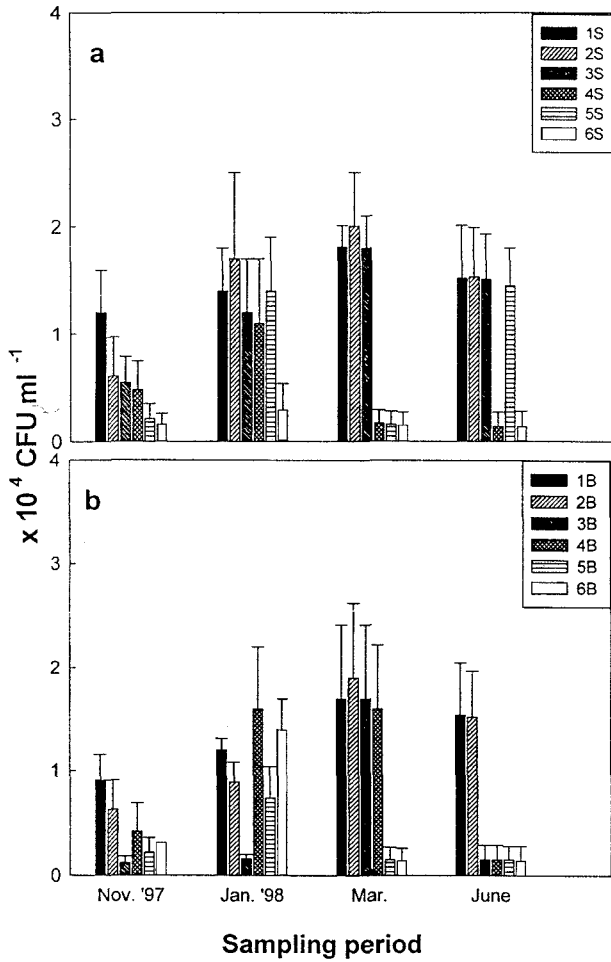
양하여 계수하였다.

### 3. *Vibrio* 속의 분리동정

*Vibrio* 속의 분리동정은 Bacto-TCBS agar에서 37°C로 2일간 배양 후 자란 균주를 선택하여 Gram-negative (GN) microplates (Biolog Inc. USA)에 시료를 각각 20  $\mu\text{l}$ 씩 접종하여 25°C에서 12시간 배양 후 Biolog Microstation System™ (Biolog, USA)으로 동정하였다. 동정된 세균간의 통계학적 유사도는 Biolog Microstation System™에서 채택한 96종의 조사항목을 average linkage clustering 방법으로 분석하였다(Sneath & Sokal 1973; Pielou 1984).

### 4. Plasmid의 존재 확인

각 *Vibrio* 균에서 plasmid DNA의 존재는 alkaline lysis법(Maniatis et al. 1982)을 사용하여 분리된 균에 Solution I [50 mM glucose, 25 mM Tris · HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)], Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS), Solution III (5 M potassium acetate, glacial acetic acid, H<sub>2</sub>O)를 첨가하여 잘 섞은 다음 4°C에서 12,000 g로 5분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 분리한 상등액(500~600  $\mu\text{l}$ )을 새로운 1.5 ml tube에 취하여 0.1 volume (500~600  $\mu\text{l}$ )의 isopropanol을 넣고 섞어준 다음 5분간 원심 분리한 후 상등액은 버리고 침전된 DNA pellet을 차가운 70% ethanol로 2~3회 세척하여 건조

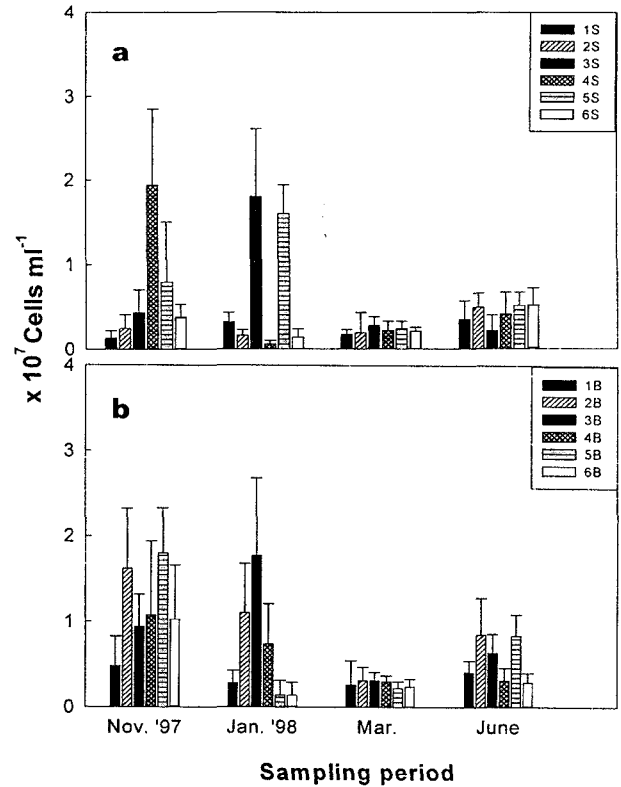


**Fig. 2.** Population densities of heterotrophic bacteria by plate count method at (a) surface and (b) bottom waters at each sampling stations during November, 1997 and June, 1998.

시켰다. 이를 50  $\mu$ l TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA]에 녹인 다음 1  $\mu$ l의 RNase로 37°C에서 4 시간 처리한 후 0.8%의 Agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

**5. 항생제 내성**

분리 동정된 *Vibrio* 균주들의 항생제 내성의 측정은 항생제 (antimicrobial drug)로 Sigma사 제품의 kanamycin (K), chloramphenicol (C), gentamicin (GM), streptomycin (S), ampicillin (AM), tetracycline (TE), carbenicillin (CB)을 사용하였다. 항생제 내성의 측정은 TCBS 배지에서 분리 동정된 균주를 각각의 항생제가 첨가된 (25~100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) LB (Luria broth) 배지 (tryptone 1%, sodium chloride 1%, yeast extract 0.5%, agar 1.5%)에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양하여 측정하였다



**Fig. 3.** Population densities of heterotrophic bacteria by AODC method at (a) surface and (b) bottom waters at each sampling stations during November, 1997 and June, 1998.

(Timoney *et al.* 1978).

**6. 해수에서의 생존율 측정**

해수의 온도에 따른 *Vibrio* 균의 생존을 측정하기 위하여 본 실험에 동정된 3균주들 (*V. angullarum*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*)을 각각 LB 배지가 함유된 125 ml Erlenmeyer flask에 접종한 후 37°C에서 16 시간 동안 진탕배양수조 (120 rev min<sup>-1</sup>)에서 배양하여 이들의 균체수를 측정하여 최초 접종균체수 (initial population number)로 하였다. 최초 접종 균체수가 측정된 각 균주들은 25 ml의 여과된 해수가 들어있는 125 ml Erlenmeyer flask에 각각 1 ml씩 접종하였다. 이때, 생존 실험에 사용한 해수는 실험실에서 6개월 이상 실온에서 방치한 aged seawater로써 0.2  $\mu$ m nitrocellulose filter (Gelman)를 이용하여 여과한 후 사용하였다. 접종된 각 해수는 4, 15, 25°C에서의 30일간 진탕 배양하면서 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30일에 각각 채취하여 LB 평판배지에 도말한 후 37°C에서 16시간 동안 배양하여 각각의 균체수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 해양중속영양세균의 분포

조사기간 중 평판도말법으로 측정된 중속영양세균의 균체수를 살펴보면, 표층의 경우,  $1.5 \pm 1.2 \times 10^3 \sim 2.0 \pm 1.5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>의 범주에서, 저층의 경우,  $1.2 \pm 0.6 \times 10^3 \sim 1.9 \pm 1.2 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>의 범주에서 분포하였다 (Fig. 2). 1차와 2차 조사가 이루어진 시기는 겨울철이어서 3차와 4차에 조사된 값에 비해 균체수가 낮은 값을 보였다. 조사기간 중 균체수의 최저값은 표층과 저층 모두 97년 11월에 정점 3과 6에서 각각 나타났고 최대값은 98년 3월에 표층과 저층 모두 정점 2에서 나타났다. 이러한 측정값은 이(1990a)가 군산부근 조간대에서 측정한 값과 거의 유사한 범주였다.

형광현미경에 의한 직접측정법으로 측정된 총 해양 중속영양세균의 균체수는 표층의 경우,  $6.0 \pm 4.0 \times 10^5 \sim 1.9 \pm 1.5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>의 범주에서, 저층은  $1.4 \pm 0.2 \times 10^6 \sim 1.8 \pm 0.5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>의 범주에서 분포하였다. 조사기간 중 균체수의 최저값은 98년 1월 (2차 조사기간)에 표층은 정점 4에서, 저층은 정점 5와 6에서 각각 나타났고, 최대값은 97년 11월 (1차 조사기간)에 표층은 정점 4에서, 저층은 정점 5에서 각각 나타났다 (Fig. 3). 각 조사 시기와 정점별 균체수의 분포양상은 평판도말법에 의해 측정된 값과 비교할 때 많은 차이를 보였는데 이는 평판도말법의 경우, 빈영양 상태에서 잘 자라는 세균들 (oligotrophs)이 배지상에서는 잘 자라지 않아 직접측정법과 균체수가 많은 차이를 보이는 것으로 생각된다. 하지만 직접측정법의 경우도 덩어리를 이루는 세균과 시료에 떠있는 미생물 사체나 유기물 입자 등은 활성을 나타내는 세균과의 구별이 불분명한 경우가 종종 있어 균체수 측정에 오차를 일으킬 수 있으므로 두 방법을 동시에 사용하여 서로의 단점을 보완시켰다 (Jannasch & Jones 1959; Kogure *et al.* 1979; Dahle and Laake 1982).

전반적으로 직접측정법으로 계수한 균체수는 평판도말법으로 측정된 값보다 30~1,500 배 높게 나타났는데 이는 평판도말법으로는 검출되지 않는 VBNC (viable but nonculturable)가 직접측정법에서는 검출되었기 때문인 것으로 생각된다 (Lee 1990).

### 2. 해양 *Vibrio*의 분포

4차에 걸쳐 조사된 해양 *Vibrio*의 분포는 1~4차의 조사기간 중 각각  $1 \times 10 \sim 6 \pm 2.2 \times 10^2$  CFU ml<sup>-1</sup>의 범주에서 분포하였으며 전반적으로 겨울철이 여름철에 비

해 낮게 나타났다. 조사기간 중 표층에서는  $1 \times 10 \sim 6 \pm 2.2 \times 10^2$  CFU ml<sup>-1</sup>의 범주에서, 저층에서는  $1 \times 10 \sim 4.3 \pm 4.0 \times 10^2$  CFU ml<sup>-1</sup>의 범주에서 분포하였다. 이러한 분포 양상은 *Vibrio* 속의 해수에서의 분포에 수온의 변화가 직접적으로 관련이 있다는 보고 (Kaneko & Colwell 1978; Leslee & LaRöck 1985)와도 연관이 있는 것으로 생각된다. 해양 *Vibrio*가 총 중속영양 세균에 대하여 차지하는 비율은 97년 11월의 경우, 표층과 저층에서 각각 0.3%, 0.2%를 차지하였고, 98년 1월은 표층에서는 전혀 나타나지 않았으며, 저층에서는 0.2%를 차지하였다. 한편, 98년 3월에는 표층과 저층에서 모두 0.1%로 나타났다. 하지만 98년 6월은, 표층과 저층에서 각각 2%, 6%를 차지하여 다른 조사기간에 비해 비교적 높은 비율을 나타냈다. 이러한 결과는 Chan 등 (1986)에 의해 홍콩 연안에서의 총세균에 대해 *Vibrio* 속이 차지하는 비율과 유사하였다. 하지만 미국 동부 및 남동부 연안에서 보고된 결과 (15~31%)와는 큰 차이를 보였다 (Oliver *et al.* 1982, 1983). 본 연구에서 사용된 TCBS 배지에서는 *Vibrio* 속 이외에 *Aeromonas hydrophila*도 자랄 수 있으므로 진정한 *Vibrio* 속에 해당하는 균체수는 본 연구에서 측정된 수보다 적을 수 있다. 하지만 최근 홍콩 등 (Kueh & Chan 1985)에서는 *Vibrio* 속은 어패류와 굴 등에서 흔히 발견되고 있어 비록 총 해양세균에 대하여 차지하는 비율은 적어도 하절기에 *Vibrio*의 성장조건이 다른 절기보다 유리하여 *Vibrio* 속은 어패류에 축적될 수 있어 감염이 다른 절기에 비해 높게 나타나는 원인 중의 하나로 생각된다.

### 3. *Vibrio* 균주의 동정 및 유사도 분석

TCBS 배지에서 순수 분리된 51종의 *Vibrio* 균주들을 Biolog Identification system™에 의해 동정한 결과 (Table 1), *V. mediterranei*, *V. anguillarum*, *V. metschnikovii*, *V. pelagius*, *V. harveyi* A, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* I, *V. splendidus* 2, *V. diazotrophicus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. holisae*로 동정되었다.

이와 같은 결과는 송 등 (1984)이 우리 나라 연안에서 동정한 *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*, *V. fluvialis*보다 더 많은 종이 본 연구에서 분리 동정되었는데, 이는 새로운 종의 출현이기보다는 송 등 (1984)에 의해 조사될 때와 비교하여 미생물 동정에 관련된 기술과 방법이 보다 더 진보되었기 때문인 것으로 생각된다.

한편, 분리 동정된 51균주들 간의 통계학적 유사도를 70% 이상을 기준으로 grouping한 결과 26 group으로 나뉘어 (Fig. 4), 본 조사해역에서 조사된 *Vibrio* 속간에는

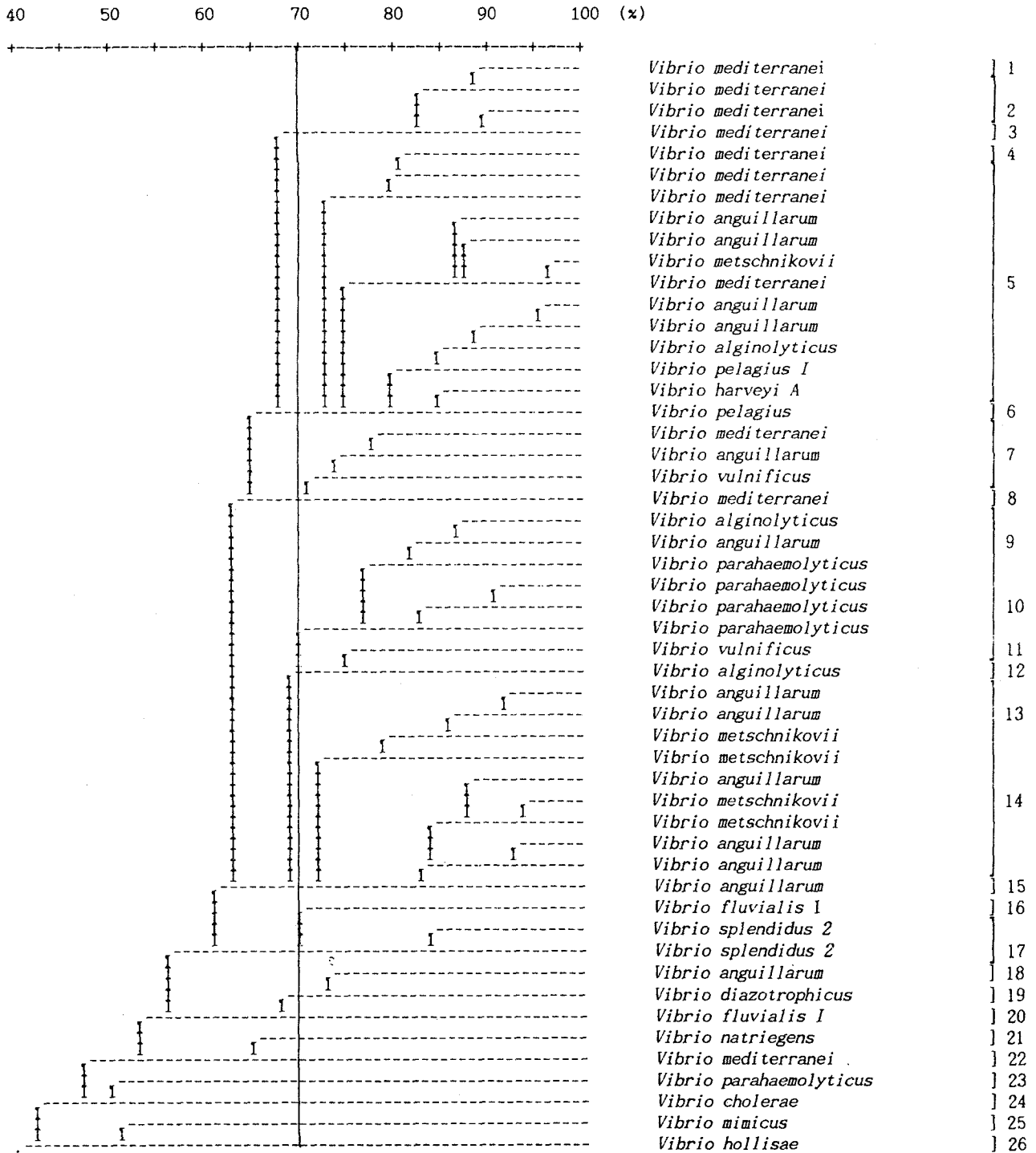
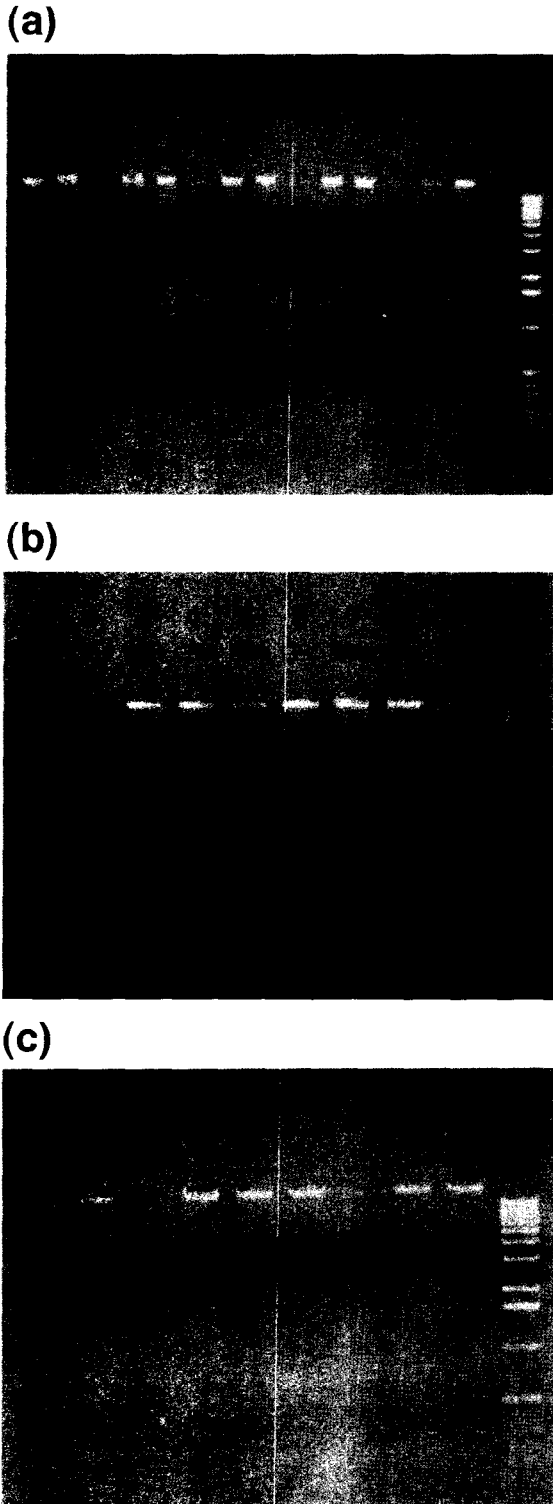


Fig. 4. A dendrogram of *Vibrio* spp. isolated in the intertidal zone near Kunsan of the Yellow Sea.

비록 표현형 (phenotype)으로는 유사하여도 유전적으로는 서로 연관성이 멀 것을 의미하며 이는 본 조사해역에서 발견되는 *Vibrio* 속의 다양성을 간접적으로 보여주는 것이다.

#### 4. 동정된 *Vibrio* 균주들에서 Plasmid의 존재 확인

동정된 51균주의 *Vibrio* 균주들에서 plasmid의 존재를 확인한 결과 33균주(65%)에서 plasmid의 존재를 확인하였고, 나머지 균주들에서는 확인되지 않았다. 이러한



**Fig. 5.** The electrophoretic profile of the plasmid DNA contained in *Vibrio* strains. Fragments were electrophoresed on 0.8% agarose at 100 volts for 90 min and stained with ethidium bromide. Lane 16 (a) and 10 (b, c): DNA size-marker 1 kb ladder, Lane 1-15 (a), 1-9 (b, c): plasmids of *Vibrio* strains.

**Table 1.** A list of fifty-one *Vibrio* spp. which was identified by Biolog Identification System™ from Yellow Sea near Kunsan

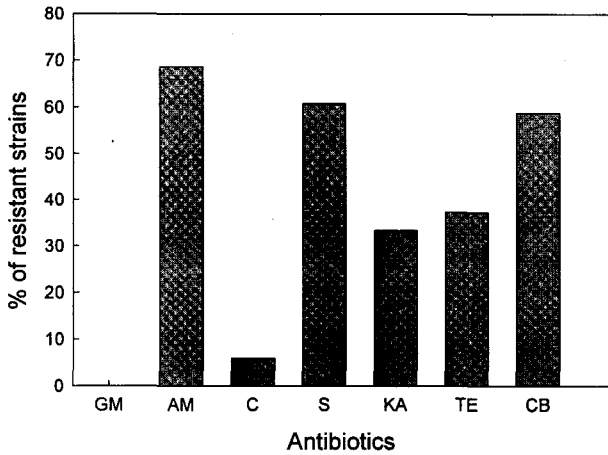
Strains	No. of isolates
<i>V. mediterranei</i>	11
<i>V. anguillarum</i>	13
<i>V. metschnikovii</i>	5
<i>V. pelagius</i>	2
<i>V. harveyi A</i>	1
<i>V. vulnificus</i>	2
<i>V. alginolyticus</i>	3
<i>V. parahaemolyticus</i>	5
<i>V. fluvialis I</i>	2
<i>V. splendidus 2</i>	2
<i>V. diazotrophicus</i>	1
<i>V. cholerae</i>	1
<i>V. mimicus</i>	1
<i>V. hollisae</i>	1

결과는 Hada와 Sizemore (1984)에 의해서 동정된 *Vibrio* 중 40%에서 plasmid의 존재를 확인한 결과보다 더 높은 것으로 나타났다. 또한 Fig. 5에서 보는 바와 같이, plasmid의 크기는 대부분이 12 kb 이상을 나타냈다.

#### 5. 동정된 *Vibrio* 균주의 항생제 내성

분리 동정된 51 균주의 *Vibrio* 속에 대해 7종류의 항생제 (gentamicin, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, kanamycin, tetracycline, carbenicillin)에 대한 내성을 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard)법에 따라 조사하였다. 그 결과 51균주 중 한 종류 이상의 항생제에 대하여 내성을 갖는 균주는 모두 49균주로써 전체 조사 균주의 96%를 차지하였다. 7종의 항생제 중 조사 균주들에 대해 가장 많은 내성을 보인 항생제는 ampicillin (AM)으로써 실험대상 균주들 중 35균주에 대해 내성을 보여 69%의 높은 비율을 차지하였고, streptomycin (S)에 대해서도 31균주가 내성을 나타내어 61%를 차지하였다 (Fig. 6). 또한 carbenicillin (CB)과 kanamycin (KA), 그리고 tetracycline (TE)에 대해서도 각각 59%, 33%, 37%의 균주가 내성을 보였다. 반면 chloramphenicol (C)에 대해서는 3종의 균주만이 내성을 나타냈고, 나머지는 감수성을 보였으며, gentamicin (GM)에 대해서는 조사 균주들 모두가 감수성을 나타냈다 (Fig. 6). 이러한 결과는 Hada와 Sizemore (1984)가 연구한 S, C, TE에 대해 각각 62.7%, 4.7%, 44.9%가 내성을 보인다는 결과와 유사하였다.

본 연구에서 조사된 51균주의 *Vibrio* 속의 항생제 내성은 조사 균주의 65%가 plasmid를 갖고 있는 앞의 결과와 연관이 있는 것으로 추정되나 항생제 내성과 이들



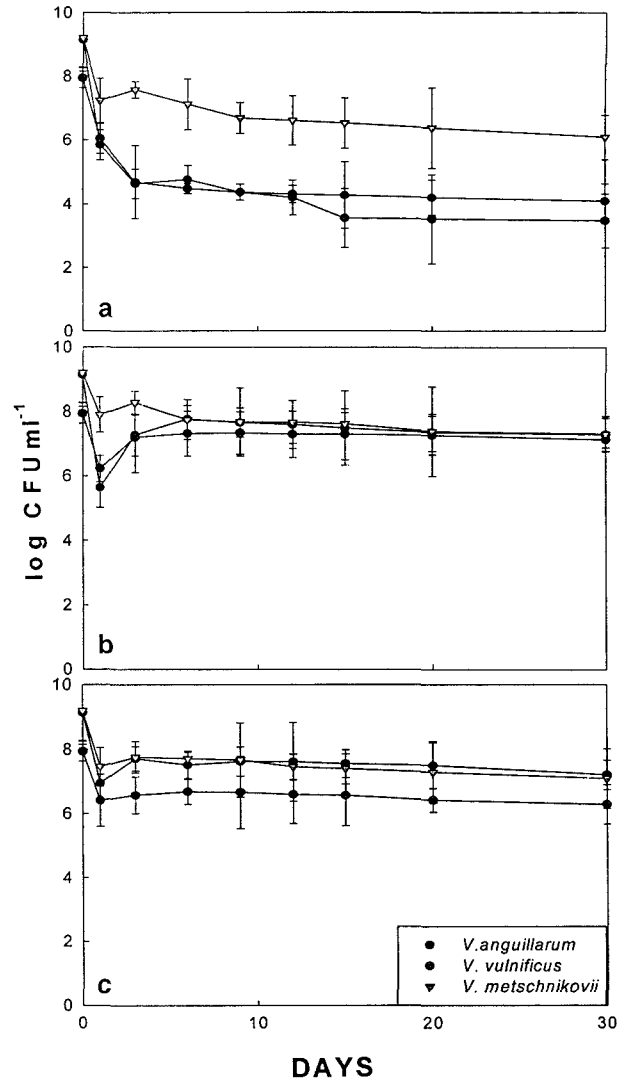
**Fig. 6.** Resistance patterns of 51 *Vibrio* strains isolated in the intertidal zone near Kunsan of the Yellow Sea to 7 kinds of antibiotics. GM: gentamicin; AM: ampicillin; C: chloramphenicol; S: streptomycin; KA: kanamycin; TE: tetracycline; CB: carbenicillin.

plasmid와의 직접적인 관련성은 본 연구로서는 정확히 알 수 없었으며 앞으로 좀더 연구해야 할 과제라고 생각한다.

**6. 해수환경에서의 온도에 따른 생존 측정**

본 실험에서 동정된 *Vibrio* 균주 중 3종 (*V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. metschnikovii*)을 선정하여 membrane filter (0.2 μm pore size)로 여과된 해수에서 수온을 각각 4, 15, 25°C로 달리하여 생존을 측정하였다.

측정 결과, 최초로 접종된 균체수는 각 온도에서 30일간 방치시키는 동안 균주에 따라 균체수는 10<sup>-1</sup>~10<sup>-5</sup>까지 감소하였다. 이를 각 온도별로 살펴보면, 4°C에 각 실험 균주를 접종하였을 경우, 조사기간 중 균체수는 균주에 따라 각각 10<sup>-3</sup>~10<sup>-5</sup>로 감소하였다. *V. anguillarum*과 *V. vulnificus*는 접종 후 3일만에 최초 접종 균체수의 10<sup>-5</sup>로 크게 감소한 후 10일 이후부터 균체수의 감소는 30일까지 비교적 완만하게 나타났다. *V. metschnikovii*는 다른 두 균주에 비해 최초 접종 후 3일까지는 감소율이 비교적 낮은 편이며 10일 이후부터는 다른 두 균주와 유사한 양상으로 감소하였다. 실험 균주가 접종 후 최초 3일에 균체수가 급격히 감소되는 원인은 빈영양 상태에 적응이 안되었기 때문인 것으로 사료된다. 하지만 10일 이후부터는 해수에 남아있는 균주들은 빈영양 상태의 충격에 적응되어 생존율이 일정하게 유지되는 것으로 생각된다. 한편, 15°C와 25°C에 접종하였을 경우, 각 균주들은 4°C에서 배양하였을 때보



**Fig. 7.** Survival of *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, and *V. metschnikovii* in the seawaters incubated at (a) 4°C, (b) 15°C, and (c) 25°C, respectively.

다는 생존율이 다소 높았으며, 균주에 따라 균체수는 측정기간동안 10<sup>-1</sup>~10<sup>-2</sup>의 감소를 보였다. 이를 각 균주별로 살펴보면, *V. anguillarum*과 *V. vulnificus*는 15°C와 25°C에서 최초 접종 후부터 2일까지는 급격한 감소를 보인 후, 2일에서 5일까지 다소 증가한 뒤 그 이후로는 균체수의 감소가 거의 없었고 30일까지도 상당한 균체수가 생존하고 있음을 알 수 있다. 또한 *V. vulnificus*의 경우, 4°C와 25°C보다는 15°C에서 생존율이 다소 높았고, *V. metschnikovii*는 다른 두 균주와 비교할 때, 각 온도에서 낮은 감소율(10<sup>-1</sup>~10<sup>-3</sup>)을 보여 다른 두 균주들과 비교하여 온도 변화에 높은 적응력을 보였다(Fig. 7). 대부분의 *Vibrio* 균주들의 이화학적 환경요인 중 균

주의 생존에 중요한 영향을 미치는 요인으로서 온도와 염분을 들 수 있고, 또한 일부 *Vibrio* 균은 계절 변화에 따른 수온보다는 염분에 따라 큰 영향을 받는다고 했다 (Kasper & Tamplin 1993). West 등(1986)은 9°C 이하의 수온을 유지하는 해수에서는 일부 *Vibrio* 균주를 분리할 수 없음을 보고하여 *Vibrio* 속의 균주가 수온에 민감한 영향을 받는다는 것을 시사하고 있으며, *Vibrio* 속의 생존에 필요한 최적 온도는 13~30°C (Kasper & Tamplin 1993)로써, Tamplin 등(1982)에 의한 Florida 하구에서의 *Vibrio* 균주에서는 염분 17‰, 수온 17°C 이상일 때, Seidler (1980)는 수온 10~15°C, 염도 27.5~32.5‰의 해수에서 분리가 잘 되는 것으로 보고하였다. Kelly (1982)는 여름과 가을철에 채수한 해수나 어패류에서 *Vibrio* 균주의 분리율이 높다고 보고하였다. 본 실험에서도 군산인근해역에서 6월에는 비교적 높은 분포율을 보여 우리 나라의 서해안의 여름철 수온은 *Vibrio*의 생존에 적합함을 간접적으로 시사하고 있다. 그러므로 이러한 요인은 우리 나라 서해안에서 해수나 어패류에 의한 감염이 하절기에 증가하는 원인이 되기도 한다. 따라서 본 조사 해역에서 *Vibrio* 균주들의 동태를 밝히기 위해서는 어업 활동이 주로 행해지는 기수역이나 연안수계에서의 *Vibrio* 속의 서식 상태에 관한 지속적인 조사가 필요하며, 어패류의 증식을 위해 사용되는 연안해수가 어패류에서 *Vibrio* 속에 의한 2차 오염원일 가능성이 높으므로 이들 *Vibrio* 속에 의해 발병될 수 있는 질병의 예방책에 대한 다각적인 검토가 필요하다고 생각된다.

## 사 사

본 연구는 환경부 G7과 제 1999년도 연구비의 일부로 수행되었음.

## 참 고 문 헌

- 김신무, 김현숙(1985) 어패류에서 *Vibrio vulnificus*의 분리. 대한임상병리사회지 17 : 78-83.
- 박석동, 김형로(1986) *Vibrio vulnificus*의 세포외 용혈소의 정제 및 성장에 관한 연구. 대한의학협회지 29 : 662-667.
- 송 철, 김호훈, 강연호, 이광식, 이재관, 오해성, 서춘석(1985) 우리나라 연안 *Vibrio* 균속 분포에 관한 연구. 국립보건원보 21 : 177-182.
- 송철, 손준용, 이길용, 유재창, 박만석, 박강수, 이인택, 김병훈, 김영자(1984) 우리나라 연안의 비브리오균속 분포에 관한 연구. 국립보건원보 21 : 117-132.
- 이길용, 박만석, 주진우(1984) 한국 남해안일대의 장염 비브리오 분포 연구. 국립보건원보 21 : 133-146.
- 이다미(1990a) 군산 인근해역에서의 중속영양세균의 분포와 계절적 특성에 관한 연구. 석사학위논문, 군산대학교 pp. 49.
- 이화재(1990b) 군산연안지역에서 발생한 *V. vulnificus*의 역학적 특성과 동정에 대한 연구. 군산실업전문대학 논문집 13 : 431-447.
- 정선식, 박종호, 이준행(1987) *V. vulnificus*의 세균학적 성상에 관한 연구. 감염학회지 18 : 55-62.
- Bartley CH & LW Slanetz(1971) Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine water and oysters of New Hampshire. *Appl. Microbiol.* 21 : 965-966.
- Bauman P(1980) Re-evaluation of taxonomy of *Vibrio*. *Curr. Microbiol.* 4 : 127-132.
- Blake PA, RE Weaver & DG Hollis(1981) Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibriosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 34 : 341-367.
- Chan KY, Woo ML, Lo KW & GL French(1986) Occurrence and distribution of halophilic *Vibriosis* in subtropical coastal waters of Hong Kong. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 1407-1441.
- Dahle AB & M Laake(1982) Diversity dynamics of marine bacteria studied by immunofluorescent staining on membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 169-176.
- Farmer JJ(1985) *Vibrio* in manual of clinical microbiology. pp. 282-301.
- Hada HS & RK Sizemore(1984) *Vibrio* in the Environment; plasmid in marine *Vibrio* spp. 183-194. John Wiley & Sons Inc.
- Jannasch HW and GE Jones(1959) Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* 45 : 128-130.
- Kampelmacher EH, LM van N. Jansen, DAA Mossel & FJ Green(1972) A survey of the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* on mussels and oysters and estuarine waters in the Netherlands. *J. Appl. Bacteriol.* 35 : 431-438.
- Kaneko T & RR Colwell(1973) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113 : 24-32.
- Kaneko T & RR Colwell(1978) The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microbial Ecol.* 4 : 135-155.
- Kasper CW & ML Tamplin(1993) Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 820-824.
- Kelly MT(1982) Effect of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* occurrence in a Gulf coast environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 820-824.
- Kogure K, U Simidu & N Taga(1979) A tentative direct



- microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25** : 415-420.
- Krieg NR & JG Holt (1984) Bergey's manual systematic bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins. Baltimore/London.
- Kueh CSW & KY Chan (1985) Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J. Appl. Bacteriol.* **59** : 41-47.
- Lee GH, SJ Kim, WH Lee & DM Lee (1990) Seasonal distribution and characteristics of heterotrophic marine bacteria on the intertidal zone near Kunsan of Yellow Sea, Korea. *Kor. Jour. Microbiol.* **25** : 415-420.
- Leslee AW & PA LaRock (1985) Temporal occurrence of *Vibrio* species and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 1490-1495.
- Liston J & J Baross (1973) Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the natural environment. *J. Milk Food Technol.* **36** : 113-117.
- Maniatis T, EF Fritsch & J Sambrook (1982) Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor. New York.
- Oliver JD, RA Warner & DR Cleland (1982) Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** : 1404-1414.
- Oliver JD, RA Warner & DR Cleland (1983) Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** : 985-998.
- Pielou EC (1984) The interpretation of ecological data. Wiley & Sons, N.Y.
- Rodina AG (1972) Methods in aquatic microbiology. pp 149-180. University Park Press. Baltimore and Butterworth & Co. Ltd., London.
- Seidler RJ (1980) Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **40** : 715-720.
- Sneath PHA & RR Sokal (1973) Numerical taxonomy. WH Freeman Co., San Francisco.
- Tamplin M, Rodrick GE, Blake NJ & T Cuba (1982) Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** : 1466-1471.
- Timoney JF, J Port, J Giles & J Spanier (1978) Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. *Appl. Environ. Microbiol.* **36** : 465-472.
- West DA, Brayton DR, Bryant TN & RR Colwell (1986) Numerical taxonomy of *Vibrios* isolated from aquatic environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36** : 531-543.

## Characteristics and Survival of Genus *Vibrio* Isolated in the Intertidal Zone of the Yellow Sea near Kunsan

Hye-Young Wang and Geon-Hyoung Lee

(Department of Life Sciences, College of Natural Sciences,  
Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea)

**Abstract** - To investigate the population dynamics and survival of Genus *Vibrio*, population densities of aerobic saprophytic bacteria and *Vibrio* groups were measured 4 times in the intertidal waters of the Yellow Sea near Kunsan from November, 1997 to June, 1998. The distribution of heterotrophic bacteria during the survey periods by plate count and direct count method ranged from  $1.2 \pm 0.6 \times 10^3$  to  $2.0 \pm 1.5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup> and from  $6.0 \pm 4.0 \times 10^5$  to  $1.9 \pm 1.5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>, respectively. *Vibrio* groups were distributed in the range of  $1 \times 10$  and  $6 \pm 2.2 \times 10^2$  CFU ml<sup>-1</sup>. The proportion of *Vibrio* groups to total heterotrophic bacteria was between 0.1 and 6% during the survey periods. A total of 51 isolates was obtained from TCBS agar plates and identified to species level by Biolog Identification System™. As a result, dominant genera were *V. mediterranei*, *V. anguillarum*, *V. metschnikovii*, and *V. parahaemolyticus*, and isolates were clustered into 26 groups based on the relatedness of average linkage clustering method at 70% level. As for the susceptibility of 51 isolates to 7 kinds of antibacterial agents (gentamicin, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, kanamycin, tetracycline, carbenicillin), 96% of isolates showed high resistance to more than one antibiotics and 65% of isolates contained a plasmid, of which size was observed greater than 12 kb. The number of cells of 3 tested strains (*V. anguillarum*, *V. vulnificus*, and *V. metschnikovii*) in filtered aged seawater decreased by approximately 1 to 5 orders of magnitude during 30-d incubation. In most cases, the numbers of cells decreased rapidly until day 3, then decreased slowly by day 30. The number of cells incubated at 15°C showed higher survival than those at 4°C and 25°C. These results may be considered for the basic supporting data in the risk assessment of vibriosis in summer. [*Vibrio*, distribution, Biolog Identification system, resistance to antibiotics, survival in seawater].