

꼬막에서 分離된 장염 *Vibrio*의 性狀

*柳 在 根

*國立保健院 微生物部

吳 錫 欣·金 南 天

서울保健專門學校

The Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* Cultures Isolated in *Tegillaria*

*Jae-Keun Ryu, Suk-Heun Oh, Nam-Cheon Kim

*Dept. of Microbiology, N.I.H, Seoul, Korea, Seoul Health Junior College

Abstract

Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the *Tegillaria granosa* Linne in Costal area Inchun.

The survey has been done chiefly from the Inchun Sea ports during 5 months from Oct. 1974 to May 1975.

1. The number of *Vibrio parahaemolyticus* isolated 17(13.8%) of 117 specimens from *Anadara Subrenata*.
2. The number of *Vibrio alginolyticus* isolated 92 strains of 119 specimens from *Tegillaria granosa* Linne.
3. Bacteriological characterigation such as morphological, ecological, biochemical results of 17 isolated strain has been identified the category of typical *Vibrio parahaemolyticus* differentiation.
4. Most of Kanagawa positive strains was positive in Greig test, and considerable number of Kanagawa negative strains was also positive. The result of Greig test was almost the same between cultures in brain heart infusion broth and brain heart infusion agar.
5. Kanagawa positive strains showed same lethal activity in inoculated mice into peritoneal cavity as compared with Kanagawa negative strain.

1. 緒 論

腸炎비브리오 感染症은 여름철에 海産魚貝類의 生食으로 야기되는 急性胃腸炎의 細菌性食中毒으로 널리 認識되고 있다.^{1,2)} 특히 海産魚貝類內에서의 世代時間은 매우 짧아 魚獲後 流通過程에서 취급부주의로 일어난 汚染은 食中毒發生에 重要な 問題가 된다.^{3,7,9,10,11)}

우리나라에서는 全 等(1967)³⁾이 경북 포항 근해의 魚類 및 海水 等에서 *Vibrio Parahaemolyticus* 31 種을 分離 報告했으며, 奇 等(1967)⁴⁾은 설사원인균과 그 分布에 關한 報告를 했으며 李(1967, 1969)⁵⁾의 호염균에 關한 研究報告가 있다. 또한 柳(1969)^{6,7)}는 仁川地方의 魚貝類와 海水에서 本 菌을 分離報告 하였다. 本 實驗

은 우리나라 연안에서 比較的 汚染度가 높은 仁川灣에서 획된 꼬막으로 부터 腸炎비브리오菌의 分布를 調査한 結果를 報告하는 바이다.

2. 試驗材料 및 實驗方法

(1) 調査對象

本 調査는 1974年 10月부터 1975年 5月사이에 실시 하였으며 그 對象은 仁川灣에서 채취되어 市販되는 꼬막을 試料로 하였다.

(2) 試料의 處理

仁川灣에서 채취된 꼬막을 무균적으로 3% NaCl함유 peptone水에 投入하거나 또는 細切魚片을 上記 培地에 增菌檢査하였다.

(3) 實驗方法

被檢物은 3%의 NaCl peptone水 (pH 8.0) 植菌하여 37°C에서 14~16時間 增菌시킨 다음 TCBS 寒天平板 培地에 塗抹 分離하였으며 濃綠毛의 菌叢을 鈎苗하여 표 1의 順序에 따라 分離同定하였다. 즉 sucrose分解力이 없고 V-P反應 陰性이며 7% NaCl peptone水에서 發育하고 10% NaCl peptone水에서는 發育하지 못함

Table 1. Schema for the isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from clinical specimens.

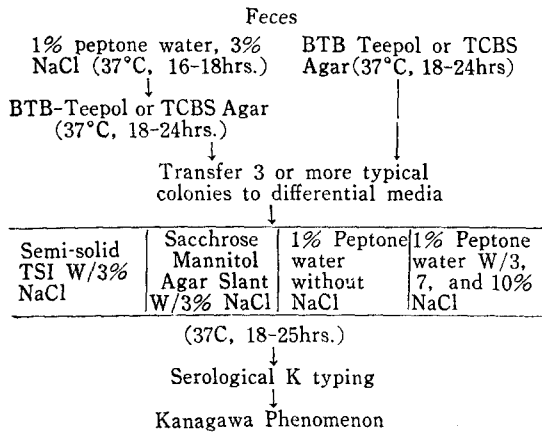


Table 2. Biochemical characteristics classified by the *Vibrio parahaemolyticus*.

Properties	Isolation strain	Control K-8
Indol	+	+
Methyl Red	+	+
Voges Proskauer	-	-
Simmons Citrate	+	+
K.I.A.	K/A	K/A
Fermentation of Glucose	+	+
Fructose	+	+
Sorbitol	-	-
Mannitol	+ or -	+ or -
Mannose	+	+
Dulcitol	-	-
Arabinose	+ or -	+ or -
Adonitol	-	-
Xylose	-	-
Maltose	+ or -	+ or -
Cellabiose	-	-
Lactose	-	-
Sucrose	-	-
Raffinose	-	-
Trehalose	+	+

때 腸炎비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)로 同定하였으며, Sucrose를 分解하고 V-P 反應陽性이며 7%와 10% NaCl peptone水에서 發育할 때 이것을 *Vibrio alginoliticus*로 同定하였다. V-P反應은 Baritt方法을 채택하였다. (표 2) 또한 抗血清은 日本 東芝化學工業社製를 使用하였으며 凝集反應은 slide上 凝集反應으로 實施하였다.

3. 實驗結果

1) 月別 *Vibrio parahaemolyticus*의 分離

1974年 10月부터 1975年 5月사이에 仁川에서 수집된 꼬막이 *Vibrio parahaemolyticus*에 汚染된 分布를 調査하였든바 表 3과 같다.

Table 3. Status of *Vibrio parahaemolyticus* contamination from *Tegillaria granosa* Linne in Inchon.

Exp. No.	No. of cases examined	No. of cases examined
74. Oct.	18	3 (17)
74. Nov.	23	4 (17)
75. Feb.	23	0 (0.0)
75. April.	25	3 (12)
75. May.	30	7 (23)
Total		

月別 *Vibrio haemolyticus*의 檢出率은 表에서 보는 바와 같이 10月 및 11月은 17%였고 2月에는 檢출되지 않았으며 4월부터 5月은 檢출율이 점차 상승되는 것으로 나타났다.

2) 月別 *Vibrio alginolyticus*의 分離

月別 *Vibrio alginoliticus*의 오염도는 표 4에서 보는 바와 같이 74年 10月에는 77%, 11月에는 69%, 75年 2月에는, 43% 이었고 4月 및 5月은 96% 및 93%로 역시 상승점을 보았다.

Table 4. Status of *Vibrio alginolyticus* contamination from *Tegillaria gramosa* Linne in Incheon

Exp. No.	Number of cases examined	Number of cases examined	Rate of isolated (%)
74. Oct.	18	14	77
74. Nov.	23	16	69
75. Feb.	23	10	43
75. April	25	24	96
75. May	30	28	93

3) 장염 비브리오 분리균주의 생태학적 성장

분리된 장염 비브리오균 7주에 대한 생물학적, 생화

실험적 혈청학적 실험을 실시 하였든바 그 성적은 表 5에 表示되었다. 즉 그 성상은 전형적인 장염 비브리오균과 일치하였다.

Table 5. Morphological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Gram stain	—	—	—	—	—	—	—
Form	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr
Flagella	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt
Mobility	+	+	+	+	+	+	+
Swarming							
1.0% Agar	+	+	+	+	+	+	+
3.0% Agar	—	—	—	—	—	—	—

* short rods=Sr Monotrichous=Mt.

Vibrio alginolyticus 균주의 생물학적, 생화학적 및 혈청학적 성상을 분리된 102주에 대해 조사하였든바 전형적인 *Vibrio alginolyticus*로 나타났다. (表 6)

Table 9. Differentiation between *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*

Characteristics	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
Growth in 7% NaCl	+ (100%)	+ (100%)
Growth in 10% NaCl	— (100%)	+ (100%)
Voges-Proskauer	— (100%)	+ (100%)
Sucrose fermentation	— (98%)	+ (99%)
Arabinose	+ (16%)	— (94%)
Celobiose (24hr.)	— (almost 100%)	— (97%)
Swarming	— (100%)	+ (96%)

4) VP의 Kanakawa現象에 의한 溶血

Kanakawa 現象陽性 및 음성균주의 용혈성을 Greig 반응으로 검사할때 어떻게 나타나는가 보기 위하여 이들 균주를 BHI와 *wagatuma* (modified) agar에서 agar를 제거한 배지에 배양하여 이것으로 Greig 반응을 검사하였던 바 성적은 제 7표와 같다.

Table 7. Properties of hemolysis in *Vibrio parahaemolyticus* by Greig & Kanagawa method.

Media	Kanagawa phenomenon	Greig Test	Rabbit			
			Result read after 2		20	
Brain heart infusion	17	+	4	4	1	8
			0	0	0	0
Brain heart infusion agar	17	+	0	7	0	4
			0	0	1	0

家兎赤血球에 대한 용혈성을 보면 BHI 배양균에서 Kanakawa現象 陽性菌의 소수만이 2時間후에 溶血을 일으키나 20時間후에는 대다수가 양성으로 나타나며 1日 배양균과 2日 배양균 사이에 큰 차이를 볼 수 없었다.

平板배지에서의 용혈을 보기 위하여 BHIA와 *Wagatuma* Agar에 5%가 되도록 家兎 및 山羊적혈구액을 가하고 여기에 공시균을 접종하여 보았던바 결과는 제 7표와 같이 家兎적혈구를 가한 BHIA에서는 Kanakawa現象양성주는 全部가 2日 배양에서 溶血이 양성으로 나타나나 1日배양에서는 확실히 양성은 없었다.

5) Mouse 독성시험

BHI agar에서 16~24시간 증식시킨균(10⁸)을 멸균 식염수에 부유시켜 mouse(18~20g) 복강內에 zml접종하여 24시간후 관찰하였던바 표 8에 表示한 바와같이 전 균주가 모두 독성을 보였다.

Table 8. Toxicity for mice

No of strain	Result			
	Number death / Number tested			
K-3(2)	3/5 (1)	2/5(1)		
K-10(4)	5/5 (2)	2/5(2)		
K-17(5)	5/5 (1)	3/5(2)	2/5 (2)	
K-32(6)	4/5 (4)	2/5(1)	1/5 (1)	

4. 考 察

장염 비브리오균은 日本, 美國 및 동남아 등지의 각 해안지대의 해수 및 어패류등에 광범위하게 오염되어 있는 것으로서 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillum* 3型으로 분류하였다.

이 장염 비브리오균중 확실한 식중독균으로서 급성 장염을 일으키는 생물형 1型균은 연안의 해수, plankton 해저의 모래, 진흙 중에 분포하여 특히 육지로부터 오염이 심한 해역 및 연안의 하천역에 많으며 특히 하절기를 중심으로 증식이 번창하고 겨울철에는 해저의 모래, 진흙속에서 증식이 저하되어 현저하게 감소된다.

본균에 對하여 일본의 淺川 등은 해수 어패류에서 靑本²⁾ 등은 동남아시아에서, 全^{3,10)} 柳⁶⁾, 李⁵⁾ 등은 국내 일부지역의 인체 및 어패류에서 분리, 보고하였다. 著者들은 1974年 10월부터 1975年 5월까지 본균의 증식도가 높고 식중독에 성행하는 비교적 기온이 낮은 계절을 선택하여 인천 연안의 패류에 본균이 존재할수 있는 검체를 대상으로 하여 시험하였던바 表 4와 같으며 온도의 변화에 따라 그 변동을 가져온 것은 柳^{6,9)} 등이 보고한 것과 일치하였다.

본균을 생태적으로 검토하여 보면 표 6에 표시된 바와 같이 액체배지에 접종하여 온도 22~42°C pH 6~11이고 염 3~7%에서 발육하는 Gram음성 단간균으로서 단채성 편모를 형성하여 활발한 운동성을 가지며 그 운동성은 *alginolyticus*와 비슷하였다.

특히 *alginolyticus*의 분리율은 계절에 따라 변화는 있으나 겨울철에도 분리되는 것을 발견하였다.

혈청학적 진단에 있어서는 최근에 형별된 52개 항원에 의하였는데 폐류에서 분리된 17주는 K-3, K-10, K-17, K-32형을 분리하였으며 mouse에 대한독성시험에서 본균의 mouse 치사율은 북강내 주사후 LD 50으로서 5/5~1/5의 범위를 나타내었다.

모든 병원세균에 있어서 병원성이 기준이 되는 성상의 추구에 대하여 많은 노력이 경주되어 왔다. 자연계에 널리 분포되어 있는 VP도 모두가 병원성이 있다고는 볼 수 없으며 특수배지에서의 용혈 즉 K現象이 병원성의 기준이 된다는 것을 주로^{12,13)} 日本 학자들에 의하여 보고 되어있다. 그러나 日本에서 얻은 VP중 식중독이나 원인식품에서 분리된 균에도 용혈성이 없는 것은 아닌데 본 실험의 결과를 고찰하면 元來 K現象이 양성으로 되어있는 균주는 모두가 Wagatsuma agar에서 24時間배양에 용혈을 일으키나 음성인 것도 용혈을 일으키는 것이 있고 특히 2日 배양에서는 K現象음성균도 대부분이 양성화 하는데 이같은 결과로 보아 K現象은 반드시 병원성의 기준이 된다고 보기는 어려울 것이다.

Mouse에 대한 치사가 사람에게 대한 병원성의 기준이 되는 것은 아니다. K現象양성주가 대체로 mouse에 대한 치사율이 높으며 따라서 VP를 많이 투여할 때 K現象양성주에 의한 中毒이 양성주에 의한 中毒보다 더 강하게 나타날 수 있음을 상상할 수 있다.

5. 結 論

1974年 10월부터 1975年 5月 사이에 인천항에서 어획된 꼬막으로 부터 *Vibrio parahaemolyticus* 및 *Vibrio alginolyticus* 균을 분리 同定하였던바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Vibrio parahaemolyticus* 균의 분리된 균은 폐류 119건에서 17주 (13.8%)를 분리하였다.

2. *Vibrio alginolyticus* 균의 분리된 균은 꼬막 119건에서 92건 (78.9%)를 분리하였다.

3. 분리된 17주의 형태학적, 생태학적, 생물학적 성상은 전형적인 장염비브리오균의 범위내에 들었다.

4. 분리된 17주의 血清型은 K-3, K-10, K-17, K-32型을 분리하였다.

5. K現象양성주는 大部分 Greig 반음양성이고 K現象음성균주中에서 Greig반음 양성인 이것 상당수 있었다.

Brain heart infusion broth와 Wagatsuma agar에서 agar를 제거한 배지에서는 성적이 거의 비슷하였다.

6. K現象양성주는 음성주에 비하여 mouse북강내주사에서 毒性이 거의 비슷하였다.

7. Mouse (ICR-TCL)에 대한 분리균주 (17주)의 치사율은 5/5가 B주 (17.6%), 4/5 4주 (23.5%), 3/5 3주 (17.6%), 2/5 6주 (35.2%), 1/5 1주 (5.9%)에 강한 특성을 보였다.

參 考 文 獻

- 1) Fujino, T.Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, K. Fukai, T. Mukai, and T. Ueho; On the bacteriological examination of Shirasu-food Poisoning. Med. J. Osaka Univ, 4:299-304, 1953.
- 2) Aoki, Y. Hsu, So, and Chun D: Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the sea and Harbors in Southeast Asia and Central Pacific, Endem. D3 Bull. Nagasaki Univ. 8:191-202, 1967.
- 3) Chun, D; Isolation of *Vibrio Parahaemolyticus* in Korea, J. Korean Med., 6:105-109, 1967.
- 4) 기용숙: 서울에서 발견된 설사원인균과 그 分布, 대한의학협회지 10. 603-607
- 5) 이종훈: 한국서해안지방에서 분리된 호염균, 최신 의학 12, 297-301, 1971.
- 6) 유재근: 어패류의 유통과정 세균오염도 조사, 388-403, Vol. 8, 1970. 공중보건의잡지
- 7) 차철환: 우리나라 항만에 대한 환경위생학적인 조사연구(仁川地區)
- 8) 이종승: 食中毒과 장염 *Vibrio* 종합의학. 제11권 제6호
- 9) Sohn, J.Y., Ryu, T. K., Min, C.H.,: Distribution of *vibrio parahaemolyticus* in the Sea and fish in Korea (in Korean) Report of NIH, Vol, 1970.
- 10) Chun, J.N.; *Vibrio parahaemolyticus* Food Infection, The New Medical Journal, Vol. XII, No. IX, Sep, 1969.
- 11) Sohn, J. Y., Ryu, J. K., Min, C.H.,: A Study on the food poisoning cause by *vibrio papahaemolyticus* Report of NIH Vol.8, 1971.
- 12) Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y. Akiyama, S., Takizawa; K. i in *vibrio hemolyticus* characteristic of *vibrio parahaemolyticus*: Its close correlation

with human patrogenicity, J. Bacterial 100:1147
-1149, 1969.

13) 兪玉滅 : 장염비브리오의 溶血性에 對하여 (日文),
장염비브리오, 제 Ⅱ集 p. 233-240.