

測定方法에 따른 腸炎비브리오菌의 檢出率의 比較

張 東 錫* · 金 榮 萬**

DIFFERENCES IN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* DETECTION RATIO
BY ANALYTICAL METHODS

Dong-Suck CHANG* and Young-Man KIM**

The differences in *Vibrio parahaemolyticus* detection ratio were compared between the isolation methods, the Most Probable Number technique and single dilution tube method.

During the period from February to October in 1976, 298 samples of sea water, 112 of bottom deposit, 169 of shellfish, and 80 of fish samples collected along the south coastal area of Korea were examined to determine the detection ratio of *Vibrio parahaemolyticus*.

It was often observed that *Vibrio parahaemolyticus* was detected in higher diluted samples even though negative in lower dilution.

Three hundred and forty three samples out of 659 samples submitted to the test by MPN procedure appeared positive for *Vibrio parahaemolyticus* showing 52% detection ratio. Whereas only 149 samples, corresponding 22.5%, were positive for *Vibrio parahaemolyticus* in the lowest dilution grade. The positive result was 24.5% in the lowest dilution grade and 50% by MPN Procedure in sea water samples, 28.6% and 65.2% in bottom deposit, 22.5% and 56.2% in shellfish and 7.5% and 32.5% in fish samples.

When tested by triplicate tubes, 61.7% of 149 *Vibrio parahaemolyticus* positive samples appeared positive in one tube, 28.9% of them were positive in two tubes and 9.4% of them were positive in all three tubes.

The detection ratio determined by MPN procedure was more than two times higher than that of single dilution in triplicate tubes.

緒 論

新鮮한 海産物에서 分離되는 腸炎비브리오菌이 韓國, 日本을 비롯하여 東南亞 各 國에서 여름철에 頻繁히 發生하는 細菌性食中毒의 重要한 原因菌의 하나라는 것은 잘 알려져 있는 事實이다. 日本에서 1950年 乾魚를 먹고 일어난 食中毒 事件에서 Fujino 등(1951) 이 이菌을 發見한 以來 堀江(1967), Ward (1968), Twedt(1969) 등, Baross와 Liston(1970), 薛

(1972), 坂崎(1974) 등 여러 研究者에 依하여 이菌의 分布 性狀 病原性 등에 對하여 많은 報告가 있다. 우리나라에서는 Chun 등 (1967) 이 浦項地方의 海水 및 魚類에서 처음으로 이菌을 分離한 以後 이등(1970), 최등(1971), 손등(1972), 梁과朱(1973), 손(1970), 朱(1975) 등 많은 研究報告가 있는데 이들의 結果는 檢出率이 여름철에도 5~30%였다. 한편 金과張(1977), 張과金(1977) 등은 水溫이 20°C 以上인 여름철에는 이菌의 檢出率이 70% 以上으로 現在까지 우리

* 釜山水産大學 食品工學科, National Fisheries University of Busan

** 東義工業專門學校, Dong Eui Technical Junior College

나라에서 報告된 여러資料와 比較할때 檢出率이 大
우 큰 差異를 나타내고 있다. 그리므로 이의 原因이
檢出方法의 差異에서 온 것으로 思慮되어 單一試驗
管用 使用하였을때와 多數의 試驗管用 使用하였을때
原試料 또는 一段階稀釋 하였을 때와 多段階稀釋 하
았을 때의 腸炎비리오菌 檢出率의 差異를 알아보
기 爲하여 實驗한 資料를 分析 檢討하여 그 結果를
報告하는 바이다.

試料 및 方法

1. 試料

本 實驗에 提供된 試料은 乍間池, 海운대, 임궁,
-용호만, 釜山綜合魚市場等 釜山地方을 中心으로 하여
馬山, 忠武, 三千浦, 麗水 등에서 海水 298, 泥土 112,
貝類 169, 魚類 80, 總 659 個로써 다음과 같이 採試
하였다.

海水 : 各 地域의 表層海水와 各 魚市場에서 使用
하고있는 海水를 250 ml 容量의 共陸廣口瓶에 採取하
여 市販携帶用 氷藏箱(18×25×20 cm)에 넣고 어음
을 비닐봉지에 넣어 箱子內의 溫度를 10°C 以下로

維持시켜 實驗室에 運搬하였다.

泥土 : 干潮時에 貝類 試料을 採取한 地点에서 大
型 스테레스틸 스폰으로 表面에서 10 cm 程度의 表
層 泥土를 잘 混合하여 滅菌된 250 ml 容量의 screw
cap 廣口 四角瓶에 넣어 海水에서와 같은 方法으로
實驗室에 運搬하였다.

魚貝類 : 貝類은 干潮時에 採試地点에서 直接 採取
하였고 그外는 大部分 魚市場에서 採試하여 다른 試
料와 같이 實驗室에 運搬하여 즉시 實驗에 着手하였다.

2. 實驗方法

Fig. 1에서와 같이 海水는 滅菌稀釋水(3%食鹽水)
로 $10^0 \sim 10^{-5}$ 까지 稀釋하여 3% 食鹽 peptone水를 使
用하였고 3個 試驗管法을 採擇하였다. 泥土는 20g을
無菌的으로 秤量하고 稀釋水 180 ml를 加하여 充分히
混合한 다음 海水에서와 같이 試驗하였다. 魚貝類는
40g을, 取하여 360 ml의 稀釋水를 加하여 滅菌된
blending容器에 넣어 waring blender(rpm12,000)
에서 90秒간 homogenize하여 海水에서와 같은 方法
으로 試驗하였다. 菌株의 選擇은 增菌된 各 試驗管에서
부터 TCBS (thio sulfate citrate bile salts sucrose)
平板培地에 劃線 培養하여 $35^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 18時間

Solid sample

20 g of bottom deposit+180 ml of the
diluent
40g of shellfish+360 ml of the diluent

Homogenization at 12000 rpm for 90
sec.

Serial 10 fold dilutions (10^{-0} — 10^{-5})
of the suspension are made by the
diluent

1 ml aliquots of the dilutions are delivered into triplicate tubes at
1% peptone water with 3% NaCl

Incubation at 35°C for 18—24 hr.

One loopful culture of each growth positive tube is
streak cultured into TCBS agar

Incubation at 35°C for 18—24 hr.

TSI ager alant

Incubation at 35°C for 24 hr.

Biochemical tests

Certify as *V. parahaemolyticus*

Sea water

Serial 10 fold dilution (10^{-1} — 10^{-5})
of immersed water are made by the
diluent

Fig. 1. Schematical presentation of the proposed isolation procedure to confirm *V. parahaemolyticus*.

測定方法에 따른 腸炎비브리오菌의 比較

經過後 集落이 둥글고 直徑이 2~3 mm, 中心部가 綠色이며 表面이 平滑한 集落을 選擇하여 TSI(triple sugar iron) 半斜面寒天培地에서 黃化水素 生成, gas 生成 및 sucrose 分解與否를 관찰한 다음 腸炎비브리오 菌으로 推定되는 菌株은 食塩耐性試驗, l-lysine 分解試驗, l-arginine 分解試驗, indole 生成試驗, acetyl methyl carbinol 生成試驗, gram 染色 등을 包含하여 腸炎비브리오菌 分離에 必要한 最少限의 試驗項目이 設定되어 있는 Huge와 Sakazaki(1972)의 方法에 依하였고 其他 細菌學的 實驗方法은 美國 食品藥品管理廳의 方法(FDA: Bacteriological Analytical Manual, 1972)에 準하여 그 結果에 따라 腸炎비브리오菌으로 確定하였다.

結果 및 考察

1. 稀釋段階別 檢出 狀況

腸炎비브리오菌을 檢出할때 試料가 低溫保存 되었을 때는 汚染된 腸炎비브리오菌이 寒冷傷害를 입는다든지 選擇培地 上에서 增殖이 抑制되기 때문에 實際

菌數보다 훨씬 적은 數值가 얻어지며 이런 難點을 克服하기 爲하여 最確數法을 써서 測定한 結果 1973 年 東京都 内 貝類中 平均 腸炎비브리오菌數가 g당 10⁴에서 10⁶으로 높게 檢出되었다고 報告하였으며(村上 등 1975), 美國에서도 最確數法에 의해서 魚貝類에서 腸炎비브리오菌을 測定한 바 있다 (Fishbein과 Wentz, 1973). Table 1은 3개 試驗管法으로 5段까지 稀釋하여 各種 試驗을 거쳐 腸炎비브리오菌으로 斷定한 結果 중에서 代表的인 實例을 들어 놓았다.

Table 1에서 알수있는 바와 같이 海水의 境遇 4-HA나 5-YH 試料에서는 低稀釋培率에서 腸炎비브리오菌이 檢出되나 高稀釋培率로 감에따라 檢出率이 적어지는 가장 合理的인 結果를 얻었다. 그러나 1-MF 試料에서는 10 ml 接種하였을 境遇에는 檢出되지 않은 反面 1 ml 接種에서 檢出되었고 特히 3-MU 試料의 境遇 試料 10 ml, 1 ml, 0.1 ml, 0.01 ml, 를 接種한 試驗管에서는 檢出되지 않고 0.001 ml를 接種한 3個 試驗管 中 1個의 試驗管에서 腸炎비브리오菌이 檢出되는 非正常的인 結果를 나타내고 있다. 以上の 結果에서 推定할 수 있는 것은 어떤 試料에서 이 菌의 存在與否를 實驗할때 여러 段階別로 稀釋하

Table 1. Some examples of positive cases in the isolation of *V. parahaemolyticus* by 3 tubes MPN method

Sample	Code of sampe	No. of positive tubes observed at each dilution					
		10 (ml, g)	1 (ml, g)	0.1 (ml, g)	0.01 (ml, g)	0.001 (ml, g)	0.0001 (ml, g)
Sea water	1-MF	0	2	0	0	0	
	2-MH	0	1	0	3	1	
	3-MU	0	0	0	0	1	
	4-HA	3	0	0	0	0	
	5-YH	3	2	1	0	0	
Bottom deposit	1-YH		3	2	0	0	0
	2-EG		3	3	2	2	1
	3-YH		0	3	0	3	0
	4-JC		2	2	1	1	0
	5-MP		0	0	0	2	0
Shellfish	1-EO		1	0	0	0	0
	2-YC		1	1	2	2	0
	3-JB		2	1	3	0	0
	4-EO		0	0	1	0	0
	5-EO		0	1	0	0	0
Fish	1-MG		0	0	0	0	2
	2-YB		0	0	0	1	0
	3-SJ		0	1	0	0	0
	4-CA		0	0	1	0	0
	5-SN		0	0	0	1	1

저 않고 從來와 같이 1個 試驗管에 增菌, 實驗하였을 境遇 檢出率에는 큰 差異가 있을 것이라고 쉽게 짐작할 수 있다.

泥土의 境遇 1-YH 試料에 있어서는 1g 接種에서는 모두 陽性이고 0.1g 接種에서는 2個 試驗管이 陽性이, 그 以下の 稀釋에서는 全然 檢出되지 않았고 2-EG 試料나 4-JC 試料의 境遇는 1-YH 試料과 같이 大體的으로 合理的인 陽性率을 나타낸 것을 볼때 定性試驗에서는 여러段階까지 稀釋하지 않

아도 無妨하겠으나 3-YH나 5-MP 試料는 그렇지 않았다. 특히 5-MP 試料에 있어서는 1g, 0.1g 0.01g씩을 接種培養한 試驗管에서는 檢出되지 않았는데 0.001g을 接種한 3個 試驗管 中에서 2個가 陽性으로 나타나 結局 5-MP 試料도 腸炎비브리오菌에 汚染되어 있음을 알 수 있었다. 以上과 같은 現象이 貝類나 魚類에서도 나타났는데 특히 魚類의 境遇가 다른 試料에서 보다 特異한 境遇가 많았다. 이와같은 結果로 미루어 보아 어떤 試料에서 腸炎비

Table 2. Comparison of detection of *V. parahaemolyticus* by dilution grade

Sample	Number of samples	Positive samples					
		Lowest dilution		Higher dilution		Total	
		NS	%	NS	%	NS	%
Sea water	298	73	24.5	76	25.5	149	50
Bottom deposit	112	32	28.6	41	36.6	73	65.2
Shellfish	169	38	22.5	57	33.9	95	56.2
Fish	80	6	7.5	20	25.3	26	32.5
Total	659	149	22.6	194	29.5	343	52.0

NS: No. of samples

브리오菌의 汚染與否를 判定할 때 稀釋하지 않은 原料나 稀釋이 적게된 試料를 接種 培養한 試驗管에서 檢出이 안된다고 하여 만드시 많이 稀釋된 試料를 接種한 試驗管에서 檢出이 안된다고 볼 수 없으며 또 같은 稀釋段階의 試料를 여러개의 試驗管에 똑 같이 接種을 하여도 檢出이 되는 試驗管과 檢出이 안되는 試驗管이 있음을 알 수 있다. 그러므로 어떤 試料의 腸炎비브리오菌 汚染與否를 正確히 判하려면 한개의 試驗管에 一定量의 試料를 넣어서 增菌하여 實驗하는 것보다 여러 段階稀釋을 하고 各 稀釋段階別로 接種하는 試驗管 數를 늘리는 것이 좋을 수 있다.

2. 檢出率의 比較

腸炎비브리오菌은 檢出함에 있어서 3個 試驗管을 사용한 最確法에 있어서 제일 낮은 稀釋段階에서 陽性으로 判定되는 比率과 제일 낮은 稀釋段階에서는 陰性으로 나타나고 이보다 높은 稀釋段階에서는 陽性으로 判定되는 境遇를 Table 2에 要約하였다.

Table 2에서 보면 總 試料 659個 中에서 343個 試料에 該當하는 52.0%가 腸炎비브리오菌에 汚染되어 있는 것으로 判定되었으나 이 中에서 제일 낮은 稀釋段階에서 陽性으로 判定된 것은 22.5%에 不過

하였고 제일 낮은 稀釋段階를 除外한 보다 높은 稀釋段階에서 陽性으로 判定된 것이 29.5%에 達하여 좋은 對照를 보이고 있었다. 이를 다시 試料別로 보면 海水에 있어서는 總 298個 試料 中에서 제일 낮은 稀釋段階에서 陽性으로 判定된 것은 50%(149個 試料)中 24.5%, 泥土의 境遇에서는 65.2%(73個 試料)中 28.6%, 貝類의 境遇에서는 56.2%(95個 試料)中 22.5%, 魚類의 境遇에서는 32.5%(26個 試料)中

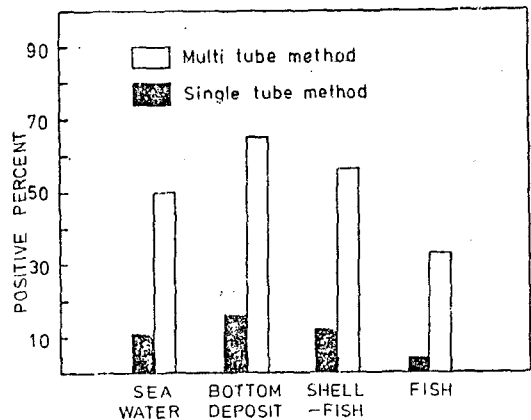


Fig. 2. Comparison of detection ratio of *V. parahaemolyticus* by the detection method.

測定方法에 따른 腸炎비브리오菌의 檢出率의 比較

7.5%로 나타났다. 即 여러 段階로 稀釋하여 檢出한 것과 바로 1段階에서 3個 試驗管法으로 檢出한 것과 陽性率을 比較하여 보면 前者가 後者의 2.31倍였으며, 試料別로 보면 海水에서는 2.04倍, 泥土에서는

2.28倍, 貝類에서는 2.49倍, 魚類에서는 4.33倍로서 모두 2倍以上 높았다. 한편 最確數法과 1個 試驗管을 사용했을 때의 檢出率은 Fig. 2 에서와 같이 前者가 後者의 4.0倍 以上으로 더욱 큰 差異를 나타 내었다.

Table 3. Comparison of positive cases of *V. parahaemolyticus* by the number of tubes conducted in first dilution grade

Sample	No. of positive tubes in triplicate	No. of positive cases in first dilution	Percent in all positive cases
Sea water	1	51	69.9
	2	19	26.0
	3	3	4.1
Bottom deposit	1	17	53.1
	2	10	31.3
	3	5	15.6
Shellfish	1	21	55.3
	2	12	31.6
	3	5	13.1
Fish	1	3	5.00
	2	2	33.3
	3	1	16.7
Total	1	92	61.7
	2	43	28.9
	3	14	9.4

첫 段階稀釋에서 使用한 3個試驗管 中 陽性으로 判明된 境遇를 要約하면 Table 3 과 같다.

即 3個 試驗管 中 모두 陽性으로 判定된 것은 不過 9.4%에 지나지 않으며, 2個 試驗管 만이 陽性인 것은 28.9%, 1個 試驗管 만이 陽性인 것은 61.7%에 이르고 있어 檢出方法(單一試驗管을 使用할 때와 複數試驗管을 使用할 때)에 따른 檢出率의 差異가 甚한 것을 알 수 있다. 이와같은 傾向은 試料別로 觀察하여 보아도 別 差異가 없이 3個 試驗管 中 1個 試驗管에서 腸炎비브리오菌이 檢出된 境遇가 제일 많고 3個 試驗管 모두 陽性으로 나타난 境遇가 제일 적었다.

要 約

腸炎비브리오菌 檢査에 있어서 檢出方法에 따른 檢出率의 差異를 알아보기 爲하여 釜山地方을 中心으로 海水 298個 試料, 泥土 112個 試料, 貝類 169個 試料 魚類 80個 試料 總 659個 試料를 單一 試驗管을 使用하였을 때와 多數의 試驗管을 使用하였을 때, 原試料 또는 一段階稀釋하였을 때와 多段階稀釋하였을 때의 檢出率을 比較 實驗한 資料를 分析 檢討하

여 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 海水에 있어서 10 ml를 接種 培養할 때에 腸炎비브리오菌 陰性인데도 같은 試料에서 1/100 또는 1/1000로 稀釋한 試料에서 腸炎비브리오菌 陽性으로 나타나는 境遇가 많았다. 이러한 現象은 泥土, 貝類, 魚類에서도 같은 傾向이었다.

2. 總 659個 試料 中에서 52%에 해당하는 343個 試料가 腸炎비브리오菌 陽性으로 判定되었는데 이 中 稀釋하지 않은 試料에서 이 菌이 檢出된 것은 22.5%인 149個 試料에 不過하였다. 試料別로 보면 海水는 50% 中 24.5%, 泥土의 境遇는 65.2% 中 28.6%, 貝類에서는 56.2% 中 22.5%에 不過하였다.

3. 最確數法에 依한 腸炎비브리오菌 檢出率은 單一稀釋法으로 測定했을 境遇의 2倍 以上이었다.

4. 3個 試驗管을 使用한 最確數法에 있어서 제일 낮은 稀釋段階에서 陽性으로 判定된 149個 試料 中에서 한個의 試驗管이 陽性으로 判定된 것이 全体 陽性率의 61.7%였고, 2個의 試驗管이 陽性으로 判定된 것은 28.9%, 3個의 試驗管 모두가 陽性인 것은 9.4%뿐이었다.

文 獻

- Baross, J. and J. Liston(1970): Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic Vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.* 20(2), 179—186.
- Chun, D. K., J. K. Lee, D. H. Shin and S. K. Moon(1967): Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* in Korea. *J. Korean Mod. Med.* 6, 105—109.
- 최위경 · 이원재 · 김세규(1971): 한국연안의 장염비브리오균에 관한 연구 2. 분리균의 특징에 관하여. *釜山醫大研報* 11(1), 63—68.
- 全燮基 · 鄭在奎 · 卓鍊斌 · 孔仁貴 · 薛盛用 · 朴清圭(1972): 海水 및 海産物에서 *Vibrio parahaemolyticus*의分離. *大韓微生物學會誌* 7(1), 71.
- 張東錫 · 金成峻(1977): 腸炎Vibrio菌의 分布 및 生理的 特性에 關한 研究. *國立水産振興院研究報告* 19, 7—52.
- Fujino, T., Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, K. Fukai, T. Mukai and T. Ueno (1951): On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *J. Jap. Ass. Infect. Dis.* 35, 11—12.
- Food and Drug Administration(1972): Bacteriological Analytical Manual for Foods. 3rd Ed., X1—X16. Division of Microbiol. Bureau of Foods, Washington D. C. 20204.
- Fishbein, M. and B. Wentz(1973): New currents in *Vibrio parahaemolyticus*. *FDA by Lines No. 2.*, September, 66—93.
- 堀江 進 · 佐伯和昭 · 奥積昌世(1967) 海水 および河口水における腸炎ビブリオ菌數の測定. *日本誌* 33(2), 126—130
- Hugh, R. and R. Sakazaki (1972): Minimal number of characters for the identification of *Vibrio* sp., *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Public Health Lab.* 30, 133—137.
- 朱鎮宇(1975): 腸炎Vibrio菌에 關한 研究. 巨濟島 近海 海水 및 海産物에서 腸炎Vibrio菌 分離에 關해서. *釜山醫大雜誌* 15(2), 79—86.
- 金榮萬 · 張東錫(1977): 釜山沿岸의 *Vibrio parahaemolyticus*分布에 關한 研究. *釜山水大研報* 17 (1, 2), 45—54.
- 이원재 · 최위경 · 김세규(1970): 한국연안의 *Vibrio parahaemolyticus*에 관한 연구. *韓水誌* 3(4), 213—218.
- 村上 · 神保勝彦 · 神崎政子 · 小久保彌太郎 · 春田三佑夫 · 山田滿(1975): 最確數法における生食用むきの推定腸炎ビブリオ數の測定. *食品衛生學雜誌* 16(4), 247—257.
- 손준용 · 유계근 · 김영환 · 이명원 · 민창홍(1970): 한국연안의 해수 및 어류에 오염된 장염비브리오 분포조사. *국립보건연구원보* 7, 87—97.
- 薛盛用 · 朴清圭 · 卓鍊斌 · 鄭在奎 · 全燮基(1972): *Vibrio parahaemolyticus*에 의한 集團食中毒例. *大韓微生物學會誌* 7(1), 72.
- 坂崎利一(1974): 國際腸炎ビブリオシンポジウムについて. *食品衛生研究* 24(2), 93—98.
- Twedt, R. M., P. L. Spaulding and H. E. Hall(1969): Morphological, cultural biochemical and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus*, with related cultures isolated in the United States. *J. Bacteriol.* 98(2), 511—518.
- Ward, B. O. (1968): Isolation of organisms related to *Vibrio parahaemolyticus* from American estuarine sediments. *Appl. Microbiol.* 16(3), 543—546.
- 梁學道 · 朱鎮宇(1973): 釜山近海의 海水 및 海産物에서 腸炎 *Vibrio*의 分離에 對한 研究. *釜山大學校 論文集(自然科學篇)* 16, 137—145.