

각종 적혈구에 대한 장염비브리오의 용혈성에 관한 연구

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

주진우

부산대학교 대학원 생물학과

김영희

= Abstract =

Studies on Hemolysis of *Vibrio Parahaemolyticus* to Various Erythrocytes

Jin-Woo Ju

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Busan National University, Busan, Korea

Young-Hee Kim

Department of Biology, Graduate School, Busan National University, Busan, Korea

The authors isolated *Vibrio parahaemolyticus* from sea water, sea mud and various marine products in Busan shore area from 1981 to 1982. Among 100 isolated strains, 66 strains showed positive reaction in Kanagawa phenomenon. With the above 66 strains, the authors carried out test for detecting hemolysis activity of *V. parahaemolyticus* on human, rabbit, chicken, pig, goat, sheep and cow erythrocytes, in different media. such as modified Wagatsuma, nutrient, peptone and brain heart infusion agar plates media.

The following results were obtained:

1. The media which can be used for Kanagawa phenomenon of *V. parahaemolyticus* were modified Wagatsuma, nutrient, peptone agar media, but not brain heart infusion agar medium.
2. The erythrocytes which showed positive Kanagawa phenomenon were those of human, rabbit, chicken and pig, but sheep, goat and cow erythrocytes showed no sensitivities.

서론

장염비브리오의 용혈성에 대해서는 Fujino et al²⁰⁾에 의해서 균분리당시부터 연구되어 졌으나 그후 많은 연구자들에 의해서 용혈성에 관한 연구가 많이 연구되었으나 반드시 꼭 같은 성적은 아니었다 (4, 5, 8, 9, 10, 19, 23).

금번 저자들은 부산근해에서 분리균주를 대상으로 하여 배지의 종류와 적혈구의 종류를 달리 사용하여 용혈현상을 연구함으로써 본균의 용혈현상에 사용할 수 있는 배지 여부와 각종 적혈구의 감수성 여부를 구명함으로써 본균에 대한 용혈반응을 수행할 때 배지의 선택 및 적혈구 선택에 도움이 되리라 사료되어 본 연구를 수행한 결과 약간의 성적을 얻었기에 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

본 논문의 요지는 1982년 대한미생물학회 제50차 추계학술대회에서 발표하였음.

재료 및 방법

1. 사용균주

부산근해의 해수, 해니, 어패류 및 조류에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus* 의 용혈균주 66주를 사용하였다.

2. 사용배지

용혈반응에 사용된 배지로서는 modified Wagatsuma(MW) 한천배지, nutrient 한천배지, peptone 한천배지 및 brain heart infusion(BHI) 한천배지에 식염을 3% 비율로 첨가하여 사용하였다.

3. 사용한 각종적혈구

사람 그리고 토끼, 닭, 돼지 산양, 면양 및 소의 적혈구를 사용하였다.

4. 용혈반응

Kanagawa (modified Atsuma method) 용혈 반응에 준하였다¹³⁾.

(1) 사용 각종 적혈구 부유액의 조제법

신선한 사람 및 각종 동물의 탈삼유소 혈액을 멸균생리식염수로 잘 씻고, 멸균생리식 염수와 세척혈구의 양이 4 : 1로 적혈구 부유액을 만들었다.

(2) 각종 적혈구를 가한 혈액한천평판배지 제조법

상술한 각종 배지에 각종 적혈구 부유액을 3% 비율로 가하여 각종 혈액한천평판배지를 만들었다.

(3) 용혈현상의 판정

각종 혈액한천평판배지 표면을 잘 건조시킨 후 균을 접종하여 37°C, 24시간 배양 후 집락의 주위에

명확한 투명대가 생긴 것을 양성으로 판정하고, 그 투명도의 정도에 의해서 집락주위의 투명환이 5mm 이상인 경우++++, 3mm 부터 5mm 인 경우+++ , 1mm 부터 3mm 인 경우++, 1mm 이하인 경우+으로 투명대가 생기지 않은 것을 음성으로 판정하였다.

성 적

1. Modified Wagatsuma (MW) 혈액한천 평판 배지상의 용혈반응 성적

MW 한천배지에 사람 그리고 토끼, 닭, 돼지, 산양, 면양 및 소 적혈구를 각각 가한 혈액한천평판 배지에 대한 용혈반응의 성적은 표 1 과 같다(표 1 참조).

사람 및 토끼 적혈구에 대한 용혈반응은 전주가

Table 1. Comparative results of hemolysis of isolated *V. parahaemolyticus* among human, rabbit, chicken, pig, goat, sheep and cow erythrocytes on modified Wagatsuma agar media

K-hemolysis	Kinds of erythrocytes						
	Human	Rabbit	Chicken	Pig	Goat	Sheep	Cow
++++ ^a	0(0) ^b	0(0)	59(89.4)	4(6.1)	— ^c	—	—
+++	66(100.0)	66(100.0)	7(10.6)	20(30.3)	—	—	—
++	0(0)	0(0)	0(0)	25(37.9)	—	—	—
+	0(0)	0(0)	0(0)	17(25.7)	—	—	—
Total (%)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)

^a++++: more than 5mm, +++: 3.0 to less than 5mm, ++: 1.0 to less than 3mm +: less than 1.0mm. ^bPercentage.

^cNonhemolysis.

Table 2. Comparative results of hemolysis of isolated *V. parahaemolyticus* among human, rabbit, chicken, pig, goat, sheep and cow erythrocytes on nutrient agar media

K-hemolysis	Kinds of erythrocytes						
	Human	Rabbit	Chicken	Pig	Goat	Sheep	Cow
++++ ^a	4(6.0) ^b	16(24.2)	65(98.5)	1(1.5)	— ^c	—	—
+++	20(30.3)	13(19.7)	1(1.5)	37(54.5)	—	—	—
++	34(51.5)	30(45.5)	0(0)	28(43.9)	—	—	—
+	8(12.1)	7(10.6)	0(0)	0(0)	—	—	—
Total (%)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)

Same as Table 1.

+++ 용혈반응이었다. 그리고 닭적혈구에 대한 용혈반응은 +++용혈균주가 7주(10.6%), ++++용혈균주가 59주(89.4%), 돼지적혈구에 대한 용혈반응은 + 용혈균주가 17주(25.7%), ++ 용혈균주가 25주(37.9%), +++용혈균주가 20주(30.3), ++++용혈균주가 4주(6.1%)이었다. 그리고 산양, 면양 및 소적혈구에 대한 용혈반응은 모두가 음성이었다.

2. Nutrient 혈액한천평판배지상의 용혈반응 성적

Nutrient 한천배지에 사람 그리고 닭, 돼지, 산양, 면양 및 소적혈구를 각각 가한 혈액한천평판배지에 대한 용혈반응의 성적은 표 2와 같다(표 2 참조).

사람적혈구에 대한 용혈반응은 + 용혈균주가 8주(12.1%), ++ 용혈균주가 34주(51.5%), +++ 용혈균주가 20주(30.3%), ++++ 용혈균주가 4주

(6.0%)이었다. 토끼적혈구에 대한 용혈반응은 + 용혈균주가 7주(10.6%), ++ 용혈균주가 30주(45.5%), +++ 용혈균주가 13주(19.7%), ++++ 용혈균주가 16주(24.2%)이었다. 닭적혈구+ +++ 에 대한 용혈반응은 +++ 용혈균주가 1주(1.5%), ++++ 용혈균주가 65주(98.5%), 돼지 적혈구에 대한 용혈반응은 ++ 용혈균주가 28주(43.9%), +++ 용혈균주가 37주(54.5%), ++++ 용혈균주가 1주(1.5%)이었다. 그리고 산양, 면양 및 소적혈구에 대한 용혈반응은 모두가 음성이었다.

3. Peptone 혈액한천평판배지상의 용혈반응 성적

Peptone 한천배지에 사람 그리고 토끼, 닭, 돼지, 산양, 면양 및 소적혈구를 각각 가한 혈액한천평판배지에 대한 용혈반응의 성적은 표 3과 같다(표 3 참조).

Table 3. Comparative results of hemolysis of isolated *V. parahaemolyticus* among human, rabbit, chicken, pig, goat, sheep and cow erythrocytes on peptone agar media

K-hemolysis	Kinds of erythrocytes						
	Human	Rabbit	Chicken	Pig	Goat	Sheep	Cow
++++ ^a	0(0) ^b	1(1.5)	66(100.0)	0(0)	— ^c	—	—
+++	5(7.5)	8(12.1)	0(0)	4(6.1)	—	—	—
++	50(75.8)	57(86.4)	0(0)	62(93.9)	—	—	—
+	11(16.7)	0(0)	0(0)	0(0)	—	—	—
Total (%)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)

Same as Table 1.

Table 4. Comparative results of hemolysis of isolated *V. parahaemolyticus* among human, rabbit, chicken, pig, goat, sheep and cow erythrocytes on brain heart infusion agar media

K-hemolysis	Kinds of erythrocytes						
	Human	Rabbit	Chicken	Pig	Goat	Sheep	Cow
++++ ^a	— ^c	—	—	—	—	—	—
+++	—	—	—	—	—	—	—
++	—	—	—	—	—	—	—
+	—	—	—	—	—	—	—
Total (%)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)	66 (100.0)

Same as Table 1.

사람의 적혈구에 대한 용혈반응은 + 용혈균주가 11주(16.7%), ++ 용혈균주가 50주(75.8%), +++ 용혈균주가 5주(7.5%), 토끼적혈구에 대한 용혈반응은 ++ 용혈균주가 57주(86.4%), +++ 용혈균주가 8주(12.1%), ++++ 용혈균주가 1주(1.5%)이었다. 닭적혈구에 대한 용혈반응은 ++ 용혈균주가 66주(100.0%), 돼지적혈구에 대한 용혈반응은 ++ 용혈균주가 62주(93.9%), +++ 용혈균주가 4주(6.1%)이었다. 그리고 산양, 면양 및 소적혈구에 대한 용혈반응은 모두가 음성이었다.

4. BHI 한천배지상 용혈반응성적

BHI 한천배지에 사람 그리고 토끼, 닭, 돼지, 산양, 면양 및 소적혈구를 각각 가한 혈액한천평판배지에 대한 분리균주의 용혈반응의 성적은 표 4와 같다(표 4 참조).

사용적혈구에 대한 용혈반응의 성적은 모두 음성이었다.

고 찰

장염비브리오의 해수, 해니 및 각종 해산물에서 서식하고 있는 해양미생물이다. 특히 생선회를 즐겨 먹는 일본 및 우리나라 국민들 사이에 여름철에 식중독증을 다발케한다. 본균의 병원성에 대해서는 오래전부터 용혈성에 의한 것으로 생각되어져 자연계에서 분리된 균주는 대부분 비용혈성으로서 비병원성이고, 환자에서 분리된 균주는 대부분 용혈성 균주로서 병원성이라고 하였다^{22,24,25,26}.

鎌谷²⁷은 장염비브리오를 혈액한천평판배지에 배양하여 용혈성 유무를 관찰하였는데 식중독 환자에서 분리된 균주는 용혈성이 있고, 자연계에서 분리된 균주는 대부분 비용혈성으로 보고하고 용혈성균주가 병원성과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 장야²⁸는 이 현상을 Kanagawa 현상이라고 명명하고 용혈성인 경우 Kanagawa 현상양성, 비용혈성인 경우 Kanagawa 현상음성이라고 하였으며 이러한 현상은 사용하는 배지의 종류, 적혈구의 종류 및 배양 시간등에 따라 다소의 차이가 있다고 하였다.

판기²⁹는 패류 및 해수에서 분리된 균주 650주에서 1%의 Kanagawa 현상양성, 아치³⁰는 자연계의 분리된 균주 749주중 Kanagawa 현상양성 1주를 보고하였다. Miyamoto et al.³¹은 환자유래균주는 용혈성균주가 많고 자연계 유래균주는 비용혈성균주가 많다고 하였다. Aoki Y et al.³²은 동남아시아 중 부대평양해역과 항만에 있어서의 장염비브리오의

분포 조사에서 308균주를 분리하고 그중 290주를 27종의 K형, 동시에 10종의 O군을 분류하였으나 용혈성균주는 분리하지 못하였다고 보고하였다. 양학도동³³은 1970년도 부산 및 경남지방에서 콜레라 유행시 설사환자에서 분리한 29주 전주가 Kanagawa 현상양성이었다. 또 1973년도 우리나라 항만에 대한 환경위생학적 부산지역 역학조사의 분리된 균주 89주에서 Kanagawa 현상양성 5주를 보고하였다. 그러나 주진우³⁴의 부산근해 장염비브리오의 분리연구는 1973년 분리된 60주에 대한 Kanagawa 현상양성률을 36주(60.0%), 또 1975년 거제도 근해 분리된 균주를 사람 및 토끼적혈구를 사용하고 배양시간을 달리한 경우의 용혈반응의 결과는 사람적혈구를 사용하고 배양시간 24시간에는 20%, 48시간에는 25%의 Kanagawa 현상양성, 토끼적혈구를 사용하고 배양시간 24시간에는 30%, 48시간에는 40%의 Kanagawa 현상양성의 성적을 보고하였다.

모든 병원성세균은 병원체가 감염과 발증의 능력이 있어 질병을 일으키거나 또는 병변을 발전시켜 질병을 일으키게 된다. 그리고 병원성세균은 전달성, 침습성, 증식성, 독소생산성 및 용혈성 생산능에 의해서 병원성 유무를 규정하게 된다. 따라서 장염비브리오는 독소생산성 및 용혈성 생산능을 가지고 있어 병원성이 있다고 사려되어지며 자연계 유래균주에서도 용혈성균주가 많이 분리되고 있어 본균에 의한 식중독환자 발생빈도도 높아질 가능성도 배제할 수 없다고 사려되는 바이다.

금번 저자들은 각종 배지와 사람 및 각종 동물적혈구를 사용하여 그 상용관계를 비교 검토하여 본 결과 MW 한천배지에서는 닭, 돼지, 사람 및 토끼의 적혈구의 순위로 감수성이 있었고, nutrient 한천배지에서는 닭, 토끼, 사람 및 돼지적혈구의 순위로, peptone 한천배지에서는 닭, 토끼, 사람 및 돼지적혈구의 순위로 감수성이 있었다. 그리고 산양, 면양 및 소적혈구에 대한 MW, nutrient, peptone 한천배지의 용혈반응은 용혈반응에 감수성이 없었다. 그리고 BHI 한천배지 용혈반응 배지로서는 부적합하였다. 이것은 한영기³⁵의 K형 현상은 BHI 한천에서 보다 modified Wagatsuma 한천배지에서 잘 나타나며 대체로 산양적혈구에서 보다 가토적혈구에서 더 잘 나타난다고 한 성적과 다소 유사한 성적이다.

천촌³⁶의 각종 적혈구를 사용한 용혈반응의 성적은 nutrient 한천배지에서 토끼, 모르못트, 닭, 쥐, 사람적혈구에서 용혈반응양성이고, 산양, 면양적혈구에서는 비용혈성이라고 보고하였으나 저자들의 성

적은 MW, nutrient, peptone 한천평판배지 상에서 사람, 닭, 토끼, 돼지적혈구는 용혈반응 양성이었으나, 산양, 면양 및 소적혈구는 용혈반응 음성의 성적은 천촌¹⁰⁾의 성적과 유사하고, BHI 한천평판배지를 사용하였을 때는 사용한 어떠한 적혈구에 대해서도 용혈반응음성을 나타낸 성적은 아치¹¹⁾의 3% 식염을 가한 BHI 한천배지에 사람의 적혈구를 가한 혈액한천평판배지에서 15-18시간 배양한 집락주위에 명확한 투명환 또는 균태밀에 생긴 용혈의 유무로서 판정한 기준과 비교하여 보면 다소의 차이가 있다고 사려되어 진다. 그러나 본 실험의 결과로서는 자연계 분리주의 용혈반응에 사용할 수 있는 배지와 적혈구의 종류를 대체로 기술하였으나 앞으로 더욱더 많은 실험연구와 추사의 연구가 기대되고 아울러 분리균주의 성상의 차이에 따라 용혈반응에 사용할 수 있는 배지도 다소 차이가 있다고 사려되어 지는 바이다.

결 론

저자들은 부산근해의 해수, 해니 및 각종 해산물에서 분리한 장염비브리오 Kanagawa 현상양성주 66균주를 사용하여 modified Wagatsuma, nutrient peptone, BHI 한천배지에서 사람 그리고 닭, 토끼, 돼지, 산양, 면양 및 소적혈구를 사용한 혈액한천평판배지에 사용균주의 용혈반응의 유무를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 장염비브리오의 Kanagawa 현상용혈반응에 사용할 수 있는 배지로서는 modified Wagatsuma 배지, nutrient 한천배지 및 peptone 한천배지 등이 고, BHI 한천배지는 부적당하였다.

2) 장염비브리오의 Kanagawa 현상 용혈반응에 감수성이 있는 동물의 적혈구로서는 닭, 토끼, 사람, 돼지적혈구 등의 순위이고, 산양, 면양 및 소적혈구 등은 감수성이 없었다.

참 고 문 헌

- 1) 서인수 : 장염비브리오 역학적 병원성에 관하여. 대한미생물학회지 **16** : 7, 1981.
- 2) 양학도, 주진우, 임종수, 김정희, 황인수, 김재수, 김희덕, 주병철 : 1970년도부산시 및 경남 지방에서 콜레라 유행시 설사환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus*에 대한 연구. 중앙의학 **22** : 319, 1972.
- 3) 양학도, 주진우, 오양효, 김영부, 유영해 : 우리나라 항만에 대한 환경위생학적조사연구(부

산지구). 국립보건연구원보 **10** : 361, 1973.

- 4) 양학도, 주진우 : 부산근해의 해수 및 해산물에서 장염비브리오분리에 대한 연구. 부산대학교 논문집(자연과학편) **16** : 137, 1973.
- 5) 양학도 : 부산근해의 해수 및 해니에서 장염비브리오균의 분리에 관한 연구. 부산의대잡지 **16** : 53, 1976.
- 6) 주진우 : 부산근해의 해수 및 해산물에서 *Salmonella*균과 장염비브리오균의 분리에 관한 연구. 부산대학교 논문집(자연과학편) **15**:377, 1974.
- 7) 주진우 : 장염비브리오에 관한 연구 - 거제도근해 해수 및 해산물에서 장염비브리오 분리에 관하여 -. 부산의대잡지 **15** : 79, 1975.
- 8) 주진우 : 일본 및 인도네시아의 설사환자에서 분리한 장염비브리오에 관한 연구. 대한미생물학회지 **13** : 37, 1978.
- 9) 주진우 : 한국 남해안일대의 장염비브리오 분포 연구 - 제주, 거제, 남해, 옥지, 부산 및 마산근해의 해수, 해저퇴적물 해산물에서 장염비브리오 분포 -. 대한미생물학회지 **18** : 1, 1983.
- 10) 주진우 : 부산근해의 해수, 해니 및 각종 해산물에서 장염비브리오 분리연구. 부산대학교 자연과학대학 논문집 **36** : 337, 1983.
- 11) 한영기 : *Vibrio parahaemolyticus*의 용혈성에 관한 연구. 중앙의학 **21** : 505, 1971.
- 12) 아치정삼랑 : 수산식품의 장염비브리오 오염 (3) - 용혈형 장염비브리오의 자연계에 있어서의 분포(일문) -. *Japan food science* **5** : 44, 1972.
- 13) 아치정삼랑 : 장염비브리오의 용혈시험용배지에 대하여(일문). *Nissan media* **58** : 3, 1970.
- 14) 장아환삼랑 : 장염비브리오의 용혈현상과 그 확인법의 통일을 위하여(일문). *Nissan media* **58** : 16, 1970.
- 15) 가장정치 : 장염비브리오의 용혈능에 의한 군별법(일문). *Morden media* **12** : 6, 1966.
- 16) 천촌 수 : *Vibrio parahaemolyticus*의 용혈성에 대하여(일문). 장염비브리오. 제 2집, p233, 남곡서점, 동경, 1967.
- 17) 판기이 - : 모든 외국에 있어서 장염비브리오연구동향 - 인도 및 오스트레일리아에 있어서 장염비브리오(일문) -. *Media circle* **137** : 163, 1971.
- 18) Aoki Y, Hsu ST and Chun DK: Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the sea and harbors in Southeast Asia and Central Pacific. *Nagasaki*

- University* 8: 191, 1967.
- 19) Chun DK, Chung JK, Tak RB and Seol SY: Nature of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 12: 81, 1975.
 - 20) Fujino T, Okuno Y, Nakada D, Aoyama A, Fukai K, Mukai T and Ueho T: On the bacteriological examination of shiasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* 4: 299, 1953.
 - 21) Miyamoto YS, Kato TI, Obara YS, Arayama SC, Takizawa KJ and Yamai SR: In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus* — Its close correlation with human pathogenicity-. *J. Bact.* 100: 1147, 1969.
 - 22) Miwatani T, Sakurai J, Yoshihara A and Takeda Y: Isolation and partial purification of thermolabile direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken J.* 15: 61, 1972.
 - 23) Sakazaki R, Iwanami S and Tamura K: Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* II. Serological characteristics. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 21: 313, 1968.
 - 24) Sakurai J, Matsuzaki AK and Miwatani TO: Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immun.* 8: 775, 1973.
 - 25) Sakurai J, Bahavar MA and Jinguji YK: Interaction of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with human erythrocytes. *Biken J.* 18: 187, 1975.
 - 26) Sakurai J, Matsuzaki AK, Takeda YF and Miwatani TO: Existence of Two distinct hemolysins in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 9: 777, 1974.