

해수와 피조개에서 *Vibrio mimicus* K-1의 생존에 대한 보관온도의 영향

고병호·이원동·안성기·김지희*·이명숙**
한성기업㈜ 식품연구소 · *국립수산진흥원 남해연구소 · **부경대학교 미생물학과

Effects of Storage Temperature on the Survival of *Vibrio mimicus* K-1 in Seawater and Arkshell

Byeong-Ho KOH, Won-Dong LEE, Sung-Kee ANN, Ji-Hoe KIM* and Myung-Suk LEE**

Research Center of Hansung Enterprise Co., LTD., Kyong-Nam 621-200, Korea

*South Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute,
Chonnam 550-120, Korea

**Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

The cell density changes of *Vibrio mimicus* K-1 in sea water and arkshell feeding it were examined at various temperature. The strain was suspended in sterilized sea water and stored at experimental temperature (5, 10, 15, 20, and 28°C). At intervals of up to 10 days, aliquots of each suspension were plated onto BHI agar. At 5 and 10°C, the plate counts of *V. mimicus* K-1 showed a rapid decline, which is known to be a result of this bacterium's entering into the viable but non culturable state. At 20 and 28°C, however, *V. mimicus* K-1 are stable over the 10 days experimental periods. *V. mimicus* K-1 was fed to arkshell, which was subsequently stored at temperatures ranging from 5 to 20°C for 10 days. The samples of arkshell were homogenized and plated at intervals to determine the cell density of *V. mimicus* K-1 and total aerobic population of bacteria present. At 5 and 10°C, the numbers of *V. mimicus* K-1 in sea water rapidly decreased over the 10 days experimental periods. However, little change of *V. mimicus* K-1 density was observed in shellstock arkshell at 5 and 10°C. While, *V. mimicus* K-1 density was decreased more rapidly to level below limit of detection in shucked arkshell at same temperature. Incubation at the higher temperature (20°C) resulted in large increase in total aerobic bacterial number of shellstock arkshell. These results suggest that even with proper storage, indigenous levels of *V. mimicus* may remain sufficiently high in shellstock arkshell to produce infection in compromise hosts.

Key words : *Vibrio mimicus* K-1, arkshell, storage temperature

서 론

Vibrio 속에서 사람의 건강과 관련된 병원균은 12종이 알려져 있는데 (Daivis et al., 1981), 이들 병원성 *Vibrio mimicus*는 *V. cholerae* non-01과 감염양상이 매우 유사할 뿐 아니라 전세계 연안지역과 담수 및 해수에 널리 분포하고 있다.

이 균에 감염될 경우 설사, 메스꺼움, 구토, 열을 수반한 복통과 같은 전형적인 식중독 증상을 나타내며 (San-yal et al., 1983; Wayne et al., 1983; Chowdhury et al., 1989), 최근들어 이에 의한 식중독 사례도 자주 발생하고 있으므로, 생선회를 좋아하는 식습관이 있는 우리나라에서도 *V. mimicus*에 대한 연구가 시급하나, 현재까지 국내에서는 본균에 대한 보고가 거의 없는 실정이다.

*V. mimicus*에 의한 감염양상은 크게 창상감염과 경구감염으로 구분되며, 경구감염의 경우 대부분이 수산물 특히 패류를 섭취하여 발생되는 경우가 많다. 한편 Morris et al. (1982)에 의하면 *Vibrio*는 저온 저항성이 약해

수온이 10°C 이하로 내려가면 증식이 억제되기 때문에, 여름철이라도 수산물을 10°C 이하로 저온보관할 경우에 균의 증식을 억제하고 균의 감소를 유도할 수 있으며, 특히 4°C에 보관하였을 때 약 90% 정도가 감소한다고 한다. 하지만 Hood et al. (1983), Cook and Ruple (1989), 그리고 Murphy and Oliver (1992)에 의하면 살아있는 패류에 *Vibrio*가 감염되었을 경우에는 패류를 10°C 이하에서 냉장보관해도 10일 이상 생존하기 때문에 질환의 원인이 될 수도 있다. 패류중 피조개는 꼬막류중에서 가장 크고 육질이 연하여 생회 등의 강정식으로 먹기 때문에 *Vibrio*가 발생하는 하절기에 문제가 되고 있을 뿐 아니라, 서식환경이 육지로부터 오염되기 쉬운 연안이고 주위 해수 중에 부유하고 있는 세균을 섭취하여 쉽게蓄積하므로 질환의 원인이 되는 경우가 많이 보고되고 있다 (Suh et al., 1986).

특히 피조개 월별 생산량은 8월과 9월에 걸쳐 가장 높아 연간 생산량의 49% 정도를 차지하는데 (농림수산통계연감, 1991), 우리나라의 피조개 소비도 생산량에 비례

하여 여름철에 집중되고 있어 여름에 생산된 피조개에 대한 세균학적 연구는 필수적이라 하겠다.

따라서 본 연구에서는 부산연안에서 분리된 *V. mimicus* K-1을 대상으로 해수와 피조개에서의 저온 저항성과 보관온도에 따른 균수의 변화에 대하여 실험한 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

피조개는 충무산 살아있는 피조개, *Anadara broughtonii*를 1993년 8월 31일 부산 자갈치 어시장에서 구입하여 일반휴대용 ice box ($20 \times 30 \times 28$ cm)에 넣고 온도를 10°C 이하로 유지시켜 실험실로 운반하여 즉시 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 시료의 무게는 $37.8\sim52.4$ g이었고, 각고는 $3.9\sim4.8$ cm, 각장은 $7.2\sim8.9$ cm, 각폭은 $6.1\sim7.5$ cm였다.

2) 사용 균주

전보 (Koh et al., 1994)에 보고한 바와 같이, 부산연안에서 분리된 균주 중에서 전형적인 *V. mimicus*의 성질을 나타태고, 항생제 내성이 강한 *V. mimicus* K-1을 공시균으로 사용하였으며, 대조군으로 국립보건원에서 분양받은 *V. mimicus* ATCC 33653을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 균수 측정 방법

피조개는 껍질표면을 70% alcohol을 묻힌 솜으로 닦은 후, 화염멸균한 칼로 탈각하여 내장과 육질을 각각 30 g씩 무균적으로 취하고 여기에 멸균 생리식염수 270 ml를 가하여 균질화 ($10,000\text{rpm}$, 90sec., Waring Blender) 한 후 pour plate method로 균수를 측정하였다. 탈각한 뒤 10°C 에 보관한 sample은 내장과 육질에서 고루 30 g을 취하여 앞과 같은 방법으로 시료를 준비하였다.

이 때 총호기성 균수 측정은 BHI agar를 사용하였으며, 피조개가 feeding한 *V. mimicus*의 균수 측정은 CL-TCBS (colistin 1 µg/ml 첨가)를 사용하였다 (Kodama et al., 1984).

2) 해수에서의 균수변화

Autoclave (Sanyo Labo Autoclave, Japan)로 멸균한 해수 500 ml가 들어있는 1,000 ml 비이커에 균수가 10^7 CFU/ml가 되도록 접종한 후, 5, 10, 15, 20, 그리고 28°C 에서 10일동안 보관하면서 보관기간에 따른 균수 변화를 측정하였다.

3) 피조개에서의 균수변화

3-1) 피조개 준비

피조개를 먼저 흐르는 물로 깨끗이 씻은 후, 멸균해수 10 l가 들어있는 20 l 수조 ($50 \times 80 \times 50$ cm)에 넣고 실온에서 36시간 적응시켰다. 해수는 재순환장치를 이용하여 5 cm거리에서 50W 자외선등 2개로 새간당 10 l씩 자외선 살균하여 계속 순환시켰으며, 18시간마다 멸균한 새로운 해수로 교체해 주었다.

3-2) Feeding 및 피조개 보관

BHI broth 1 ml당 $10 \mu\text{g}$ colistin이 함유된 배지에서 18시간 배양 (10^8 CFU/ml)한 *V. mimicus* K-1의 배양액 50 ml를 수조에 넣어 5시간 동안 feeding하였다.

Feeding 후 2개의 피조개를 취하여 control로 하였으며, 나머지는 4 group로 나누었다. 이 중 3 group은 70% alcohol로 살균한 프라스틱 통에 넣어 5, 10, 20°C 에서 보관하였으며, 나머지 1 group은 화염멸균한 칼로 탈각한 후 멸균된 250 ml 유리비이커에 넣어 10°C 에서 10일동안 보관하였다.

결과 및 고찰

1. 해수에서의 균수변화

해수에 균을 접종하여 5, 10, 15, 20, 그리고 28°C 에 보관온도에 따른 균수를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

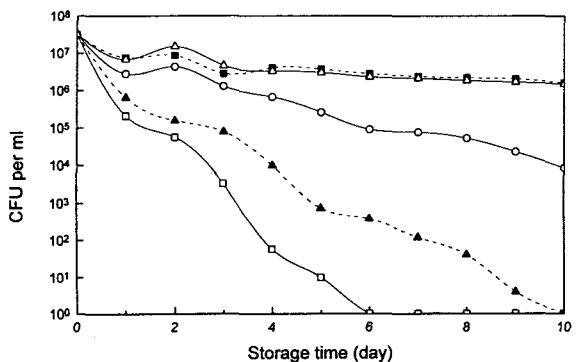


Fig. 1. Effect of temperature on survival of *V. mimicus* in sea water for 10 days. *V. mimicus* holding temperature were 5°C (□—□), 10°C (▲—▲), 15°C (○—○), 20°C (■—■), and 28°C (△—△).

5°C 와 10°C 에서는 초기균수가 3.2×10^7 CFU (colony forming unit)/ml이던 것이 보관 1일째 각각 2-log-unit와 1.5-log-unit씩 급격히 감소하였으며, 5°C 의 경우는 5일만

에 10°C의 경우는 10일만에 검출이 되지 않는 단계에 도달했다. 이 결과는 Murphy and Oliver (1992)가 *V. vulnificus*로 실험한 결과와 유사하였고, Morris et al. (1982)도 대부분의 *Vibrio*의 생육 최저 온도가 10°C라고 보고한 것으로 미루어 대부분의 *Vibrio*에서 이와 유사한 결과를 보일 것으로 사료된다.

15°C에서 보관 했을 때는 실험 전기간에 걸쳐 완만히 감소하여 10일 보관 후에 약 4-log-unit가 감소하였다. 이 결과는 Murphy and Oliver (1992)가 17°C의 인공해수에서 보관하였을 때 1-log-unit이 감소했다는 결과와는 다소 다르나, *Vibrio*의 생육에는 온도 (Nalin and Daya, 1979)뿐 아니라, Na^+ 에 의하여 생육이 촉진되고 기타 ion (Miller et al., 1982) 등에 의해서도 생존기간이 달라진다고 보고한 바와 같이 수온이 15°C의 해수에서는 *V. mimicus*가 검출될 가능성을 반영하는 결과라고 사료된다.

20°C와 28°C에서는 실험 전기간에 걸쳐 매우 안정된 모습을 보여주고 있는데 Miller et al. (1982)이 25°C의 해수에서 4달간 생존한다는 보고와는 기간 면에서 차이가 있지만, Fig. 1에서 나타난 바와 같이 20°C 이상의 해수에서는 매우 안정된 모습을 보여주었다.

한편 Chang et al. (1995)은 *V. mimicus*를 염도 30%의 해수에 균수 10^5 CFU/ml 되게 접종하여 4, 15, 26°C에 보관하면서 균수변화를 측정한 결과 생장기간이 4°C에서는 17일, 15°C에서는 12일, 그리고 26°C에서는 9일이라고 보고하여, 본 실험을 결과와는 상반된 결과를 보여주고 있어, 향후 *V. mimicus*의 분리원, 초기균수의 양, 환경조건 등에 따른 생존기간에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

피조개에서의 균수변화

피조개에 *V. mimicus* K-1을 5시간 feeding시켜, 5, 10, 20°C에서는 살아있는 상태로, 대조군으로서 10°C에서는 탈각하여 죽어있는 상태로 보관하였을 때의 균수의 변화를 실험하였다.

Feeding 직후의 초기 균수는 내장의 경우 총호기성 균수는 $1.2 \times 10^6 \text{ CFU/g}$ *V. mimicus* K-1은 $2.4 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ 었으며, 육질의 경우 총호기성 균수는 $4.1 \times 10^5 \text{ CFU/g}$, *V. mimicus* K-1은 $6.1 \times 10^3 \text{ CFU/g}$ 이었다. 피조개의 세균 축적율이 20배 정도라는 Suh et al. (1986)의 보고와 같이, 피조개의 *Vibrio* 축적율은 좋은 편이었다.

1) Shellstock arkshells, 5°C

피조개를 살아있는 상태로 5°C에서 보관하며 균수를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

V. mimicus K-1의 균수는 육질과 내장에서 전 실험기

간동안 완만한 감소율을 보였는데, 육질에서는 초기균수 $6.1 \times 10^3 \text{ CFU/g}$ 가 $6.8 \times 10^2 \text{ CFU/g}$ 으로 보관 10일 동안 약 1-log-unit가 감소하였으나, 내장에서는 $2.4 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ 가 $4.1 \times 10^3 \text{ CFU/g}$ 으로 약 1.5-log-unit가 감소하였다.

총호기성 균수의 경우 육질에서 보관 1일째에 약 1-log-unit가 감소 ($5.2 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ 으로) 하였으나, 그 후 완만하게 감소되어 10일 후에 $9.8 \times 10^3 \text{ CFU/g}$ 이 되었다. 내장의 경우 전 보관기간동안 완만한 감소를 나타내어 10일 후에는 $20 \times 10^5 \text{ CFU/g}$ 이었다.

2) Shellstock arkshells, 10°C

10°C에서 보관했을 때의 결과는 Fig. 3과 같다.

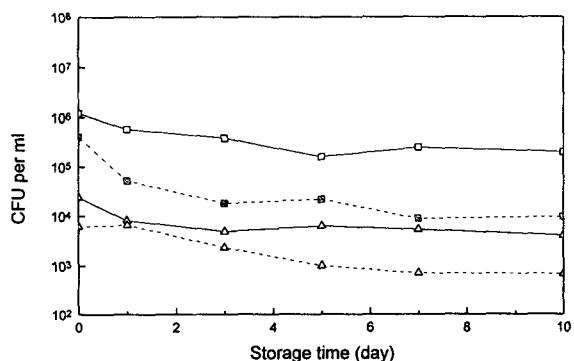


Fig. 2. Effect of temperature on survival of *V. mimicus* in shellstock arkshell at 5°C. After uptake of the *V. mimicus*, arkshell were transferred at experimental temperature and held for up to 10-days. The samples were plated at intervals onto BHI agar for total aerobic bacteria counts and CL-TCBS for *V. mimicus*. Total aerobic bacteria in arkshell intestine (□—□), *V. mimicus* in arkshell intestine (△—△), Total aerobic bacteria in arkshell meat (■—■), *V. mimicus* in arkshell meat (▲—▲).

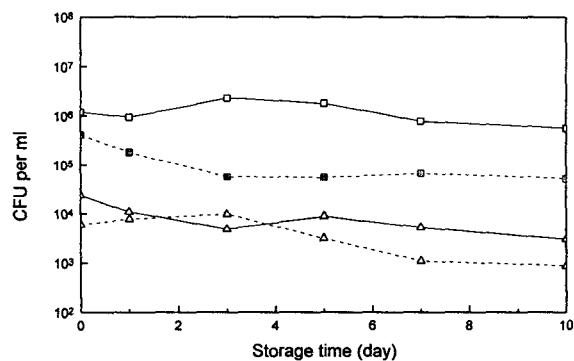


Fig. 3. Effect of temperature on survival of *V. mimicus* in shellstock arkshell at 10°C. Symbols are same as described to Fig. 2.

V. mimicus K-1의 균수는 5°C에서 보관하였을 때와 같이 육질에서는 보관 3일째까지 약간 증가 (9.7×10^3 CFU/g) 하였으나, 그 후로는 다시 감소하여 보관 10일 후에는 8.8×10^3 CFU/g으로 약 1-log-unit가 감소하였다. 내장의 경우 보관 3일째 (4.9×10^3 CFU/g)보다 보관 5일째 (8.9×10^3 CFU/g) 약간 증가하는 듯 하였으나 그후로는 전체적으로 완만한 감소율을 보여, 보관 10일 후에는 3.1×10^3 CFU/g으로 약 1-log-unit가 감소하였다.

총호기성 균수의 경우 내장과 육질에서 약간 다른 결과가 나왔는데 육질의 경우 전체적으로 완만한 감소율을 보여 보관 10일째 (5.3×10^4 CFU/g)까지 약 1-log-unit가 감소하였다. 하지만 내장의 경우는 1일째는 조금 감소 (9.4×10^5 CFU/g) 하였으나, 3일째 다시 증가하였다가 (2.3×10^3 CFU/g)가 다시 감소하는 양상을 보였으며, 보관 10일 후에는 5.6×10^3 CFU/g으로 약 0.5-log-unit가 감소하였다.

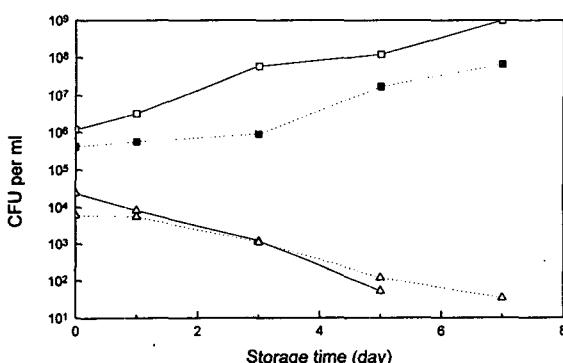


Fig. 4. Effect of temperature on survival of *V. mimicus* in shellstock arkshell at 20°C. Symbols are same as described to Fig. 2.

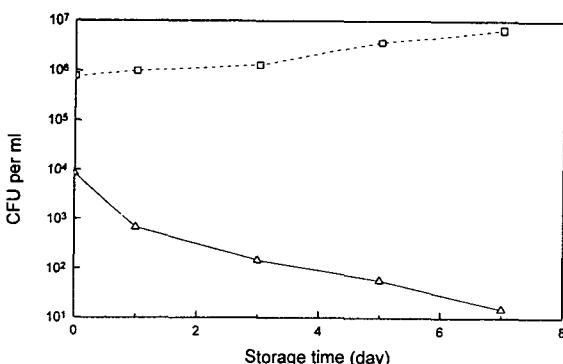


Fig. 5. Effect of temperature on survival of *V. mimicus* in shucked arkshell at 10°C. Total aerobic bacteria (□—□) and *V. mimicus* (△—△) in arkshell.

3) Shellstock arkshells, 20°C

20°C에서 보관했을 때의 결과는 Fig. 4와 같다.

V. mimicus K-1의 균수는 육질과 내장의 경우 모두 급격히 감소하여 육질에서는 7일째 내장에서는 5일째부터 검출이 되지 않았다.

총호기성 균수는 육질의 경우 3일째 (8.8×10^5 CFU/g) 까지는 다소 안정하였으나, 5일째부터는 1.7×10^7 CFU/g으로 급격히 증가하였다. 내장의 경우 육질에서는 증가가 완만했던 3일째 (5.8×10^8 CFU/g)에도 급격히 증가하였다.

관능적으로 보아도 보관 3일째 되는 날부터 피조개가 부패하기 시작하였는데 이는 보관 1~3일사이에 피조개가 죽어 내장에서부터 부패하기 시작하여 7일째는 완전히 부패한 것으로 추정되어진다.

4) Shucked arkshells, 10°C

피조개를 탈각하여 죽인뒤 10°C에 보관하며 균수를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

V. mimicus K-1의 경우 보관 1일째 아주 급격히 감소 (6.8×10^2 CFU/g)하였으며, 보관 7일 후에는 검출이 되지 않았다. 하지만 총호기성 균수는 아주 완만 증가율을 보여 보관 7일째까지 6.8×10^3 CFU/g으로 약 1-log-unit가 증가하였다.

이상 보관조건에 따른 균수변화의 결과를 조합해 보면, 5°C일때 해수에서는 급격히 감소 (Fig. 1)하였던 균수가, 피조개에서는 비교적 안정된 것으로 나타났다 (Fig. 2). 10°C에서도 5°C에서와 마찬가지로 해수에서는 감소하던 균수가 피조개에서는 별 변화가 없었다 (Fig. 3). 실제로 Kim et al. (1988)은 어육 균질에 *Vibrio*를 접종하여 4°C에 보관한 경우 약 24시간만에 90%가 감소하였다고 보고한데, 반해, Head et al. (1983), Cook and Ruple (1989), 그리고 Murphy and Oliver (1992)등은 살아있는 패류에 *Vibrio*가 감염되었을 경우에는 저온에서 보관한다 하더라도 *Vibrio*의 균수 감소에는 별 영향을 주지 않는다고 보고하고 있다. 따라서 저온에서 보관하였더라도 살아있는 피조개를 섭취할 경우에 질환의 원인이 될 수도 있다고 사료된다.

20°C에서는 균수가 안정하였던 해수에서와는 달리, 총호기성 균수는 급격히 증가하였고, 이에 따른 *V. mimicus* K-1의 균수 감소를 보였다 (Fig. 4). 이 결과는 피조개가 죽어 호기성 균수가 증가함에 따라 *V. mimicus* K-1이 억제되어 감소된 것이라고 생각된다.

10°C에서 살아있는 피조개와 탈각하여 죽은 피조개에서의 균수를 비교해 보면, Fig. 3, 5에서 나타난 바와 같이 살아있을 때는 그다지 변화가 없었으나, 죽은 피조개에서는 호기성 균수의 변화와는 상관없이 *V. mimicus* K-1

의 균수만 감소를 보였다. Murphy and Oliver (1992)에 따르면 숙주가 죽었을 경우, 숙주의 방어기작이 없어지게 되어 이에 따라 호기성균수가 증가하고, 호기성균수가 증가함에 따라 *Vibrio*를 억제하여 *Vibrio*의 균수가 감소한다고 하였는데, 본 실험에서는 호기성균수 증가에 따른 *V. mimicus* K-1이 급격히 감소하였으리라고 사료된다.

요 약

식중독 원인균으로 알려진 *Vibrio mimicus* K-1를 피조개에 feeding시켰을 때 보관온도에 따른 균수변화를 측정하여 살아있는 패류에 오염되었을 때의 저온저항성과 증식양상을 조사하였다.

보관온도에 따른 균수변화는 해수에 보관하였을 때와 피조개에 feeding하였을 때 같은 온도에서의 균수변화가 다르게 나타났다. 즉, 해수에 보관(초기균수 3.2×10^7 CFU/ml)하였을 때는 균수가 급격히 감소하여 5°C에서는 보관 5일만에 10°C에서는 보관 10일만에 검출이 되지 않았으나, 살아있는 피조개에 feeding시켜 보관하였을 때는 균수의 변화가 비교적 안정하여 보관 10일동안 약 1~1.5-log-unit가 감소하였다.

하지만 대조군으로 10°C에서 탈각하여 보관하였을 때는 호기성균의 완만한 증가와는 달리 *V. mimicus* K-1의 균수는 급격히 감소하여 보관 7일만에 검출이 되지 않아 살아있는 패류에 *Vibrio*가 감염되었을 경우에는 저온에서 보관하더라도 *Vibrio*의 균수 감소에는 별 영향을 주지 않았다.

20°C에서는 초기균수 3.2×10^7 CFU/ml가 보관 10일 후에는 1.6×10^6 CFU/ml로 균수의 변화가 안정하던 해수에 서와는 달리, 피조개에 feeding시켜 보관하였을 때는 총 호기성 균수의 경우 급격히 증가하였고 *V. mimicus* K-1의 균수도 급격히 감소하여 보관 7일째부터는 검출이 되지 않았다.

참 고 문 헌

- Chang, S. H., D. J. Song, S. J. Yang, I. S. Shin and Y. M. Kim. 1995. Effects of salinity and temperature on the survival of *Vibrio cholerae* non-01 and *Vibrio mimicus*. Bull Korean Fish. Soc., 28 (1), 60~66 (In Korean).
- Chowdhury, M. A. R., H. Yamanaka, S. Miyoshi, K. M. S. Aziz and S. Shinoda. 1989. Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol., 55 (8), 2073~2078.

- Cook, D. W. and A. Rupple. 1989. Indicator bacteria and *Vibrionaceae* multiplication in post-harvest shellstock oysters. J. Food Prot., 52, 343~349.
- Davis, B. R., G. R. Fanning, J. M. Madden, A. G. Steigerwalt, H. B. Bradford, Jr., H. L. Smith, Jr. and D. J. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J. Clin. Microbiol., 14, 631~639.
- Hood, M. A., G. Ness, G. Rodrick and N. Blake. 1983. Effects of storage on microbial loads of two commercially important shellfish species, *Crassostrea virginica* and *Mercenaria campechiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1221~1228.
- Kim, Y. M., S. H. Hur and D. S. Chang. 1988. The growth of *Vibrio vulnificus* in meat homogenates of fish and shellfish. Bull. Korean Fish. Soc., 21 (2), 80~18 (In Korean).
- Kodama, H., Y. Gyobu, N. Tokuman, I. Okada, H. Uetake, T. Shimada and R. Sakazaki. 1984. Ecology of non-O-1 *Vibrio cholerae* in Toyama prefecture. Microbiol. Immunol. 28, 311~325.
- Koh, B. H., W. J. Lee and M. S. Lee. 1994. Characteristics of *Vibrio mimicus* K-1 isolated from coastal sea water. Bull. Korean Fish. Soc., 27 (3), 292~298 (In Korean).
- Miller, C. J., B. S. Drasar and R. G. Feachem. 1982. Lancet, 1, 1216.
- Morris, J. G., H. G. Miller and R. Wilson. 1982. Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio holisae*. Lancet, 1, 1294~1297.
- Murphy, S. K. and J. D. Oliver. 1992. Effects of temperature abuse on survival of *Vibrio vulnificus* in oysters. Appl. Environ. Microbiol., 58 (9), 2771~2775.
- Nalin, D. R. and V. Daya. 1979. Infection and Immunity, 25, 768.
- Sanyal, S. C., M. I. Huq, P. K. B. Neogi, K. Alam, M. I. Kabir and A. S. M. H. Rahman. 1983. *Vibrio mimicus* as an aetiological agent of diarrhea and its pathogenesis. Indian J. Med. Microbiol., 1, 1~12.
- Suh, J. S., J. S. Ahn, H. Y. Kim, C. C. Park, J. W. Hur, H. R. Cho and I. S. Shin. 1986. Studies on the bacteriological quality and the sanitary treatment method of marine products. Report of NIH, 23, 865~895 (In Korean).
- Wayne, X., M. D. Shandera, M. Jeffrey, M. D. Johnston, R. Betty, M. S. Davis and P. A. Blake. 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly *Vibrio* species. Annals of Internal Medicine., 99, 169~171.
- 농림수산부. 1991. 농림수산통계연감. 281 pp.

1996년 10월 7일 접수

1997년 3월 6일 수리