

빛조개(*Soletellina olivacea*)로부터 분리된 비브리오의 생화학적 성상

이 훈 구

부경대학교 자연과학대학 미생물학과

본 연구는 1997년 1월부터 1997년 11월까지 낙동강 기수지역인 다대포의 모래에서 서식하는 식용 쌍패각 조개인, 빛조개(*Soletellina olivacea*)로부터 비브리오를 분리 동정한 것이다. 표현형을 중심으로한 생화학적 성상으로, 빛조개의 내장으로부터 *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* 등 5종의 병원성 비브리오를 포함한 *V. splendidus* biovar I, *V. splendidus* biovar II, *V. salmonicida* 및 *V. tubiashii* 등 8종의 비브리오가 동정되었다. 수온이 15°C 이하에서 성장이 불가능한 병원성 세균인 *V. parahaemolyticus*가 동정기에 빛조개로부터 분리됨으로서 빛조개가 자연계내에서 *V. parahaemolyticus*의 월동 보균체중의 하나라는 결론을 얻게 되었다.

Key words □ Sunset shellfish (*Soletellina olivacea*, *Nuttalia olivacea*), *Vibrio*

*Vibrio cholerae*와 *V. mimicus*를 제외한 대부분의 비브리오들은 해양에서 서식하는 호염성 세균으로, 약 40여종이 보고되어 있다(36). 이들 중 *V. cholerae*를 비롯한 10여종의 비브리오는 사람에게 설사나 식중독과 같은 장관계 질병을 일으키며, 패혈증을 비롯한 여러 합병증을 유발시킬뿐 아니라 넘치나 조개와 같은 경제성이 높은 양식 생물의 병원균이기 때문에 매우 중요한 세균속이다(9, 14, 17).

우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸인 지리적인 조건때문에 다양한 비브리오들이 서식할 것으로 생각되지만 아직까지 전 해역에 걸친 생태적인 조사는 이루어진 바가 없고 부분적으로 자료가 축적되어 있을 뿐이다(4, 26). 해수와 썰 등은 이곳에 서식하고 있는 어패류에게 비브리오를 공급해주는 보균체로서 매우 중요한 의미를 가지고 있다. 또한 일부 병원성 비브리오들은 수온이 15°C 아래에서는 성장이 불가능하며, *V. vulnificus*의 경우 숙주내에서 휴면체형태로 굴에서 월동하는 것으로 알려져 있지만 대부분은 월동이 어떤 형태로 이루어지며 월동숙주 생물이 무엇인지 명확하게 밝혀진바가 없다(32).

본 연구에서는 기수지역의 모래 속 깊이 서식하고 있는 식용 조개인 빛조개의 내장으로부터 비브리오 1차 선택배지인 TCBS 배지에서 성장된 균들을 중심으로 생화학적인 방법으로 비브리오 종수준까지 동정하였다. 이 연구를 실시한 목적은 빛조개 체내의 계절에 따른 비브리오의 변화상, 빛조개가 가지고 있는 항균제의 다약제 내성유형과, 특히 빛조개의 체내에서 *Vibrio parahaemolyticus* 등 인체병원성 비브리오의 월동 여부를 파악하기 위하여 이루어졌다.

본 연구에서 검체로 사용된 빛조개는 자패과(*Asaphidae*)에 속하는 쌍패류로서 우각은 좌각 보다 납작하다

이 조개는 식용으로 이용되나 국내에서는 분류만 된 상태이다. 조간대의 모래나 진흙이 많은 내만에 살고 있다. 빛조개(서산) 또는 벨조개(부산)등의 방언이 있으며 영명은 Sunset shell이다. 학명에 혼선이 있어 *Soletellina olivacea* 또는 *Nuttalia olivacea*로 혼용되고 있다(3).

재료 및 방법

1997년 1월부터 1997년 11월까지 부산광역시 사하구 다대포 물운대 시장에서 썰물 때를 이용하여 매일 1회씩 검체를 채취하였다. 그러나 7월은 검체채취를 2회에 걸쳐서 실시하였지만 빛조개를 포획할 수가 없었기 때문에 자료를 얻을 수가 없었다.

가검물로 사용될 빛조개는 썰물 때 호미로 모래 속을 30 cm 이상 파서 체장 3-6 cm 정도의 크기 20-30개체를 포획하였다. 조개 10마리를 한 군으로 하여 내장을 적출하여 파쇄한 후 1% 식염이 첨가된 20 ml brain heart infusion broth에 접종하였다. 1월부터 4월까지의 저수온기에는 15°C와 35°C에서 수온이 상승되는 5월부터는 35°C에서 24시간 증균시켰다. 이 증균액을 10배수로 단계희석하여 TCBS agar(thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose)에 도말하였다. 20개 미만의 집락이 형성된 평판을 선택하여 그중 황색 또는 녹색 집락을 평판배지당 4-5개씩 선택하여 1회 선발균주가 매일 30균주를 기준으로 하였고 8월부터 11월까지는 60균주씩 분리하였다. 1.6% agar가 첨가된 brain heart infusion agar에 순수 분리하고 유주하는 균주는 4% agar가 첨가된 brain heart infusion agar에서 재 순수분리 하였다.

생화학적 시험은 *Vibrio*속의 일반 분리법을 따랐고, 항균제 감수성 시험, 참조균주, O/129시험, 특별히 언급되지 않은 기본배지의 제조, 동정방법등은 모두 전보를 따랐다(23, 25). 사용된 항균제 디스크(BBL)는 ampicillin(AM-10 µg), amikacin(AN-30 µg), cephalothin(CF-30 µg), chloramphenicol(C-30 µg), colistin(CL-10

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-051-620-6363, Fax : 82-051-628-7432
E-mail : hunku@dolphin.pknu.ac.kr

µg), gentamicin(GM-10 µg), kanamycin(K-30 µg), nalidixic acid (NA-30 mg), tetracycline(Te-30 µg), tobramycin(NN-10 µg)이었고 약제 감수성기준은 NCCLS(30)를 따랐다.

대조 균주는 본 연구실에 소장된 참조균주 및 생명공학연구소 등에서 분양받은 비브리오패균 표준균주로 하였고 그 목록은 아래와 같다. *V. parahaemolyticus* ATCC 33844, *V. aestuarianus* NCIMB 2236, *V. carchariae* NCIMB 12705, *V. harveyi* KCTC 2720, *V. furnissii* ATCC 35016, *V. damsela* KCTC 2734, *V. mediterranei* NCTC 11946, *V. mimicus* NCTC 11435.

결 과

생화학적 동정

TCBS 상에서 *Vibrio*속으로 추정되는 convex, 또는 flat form의 녹색 또는 황색의 570균주가 선별되었다. 균주 분리는 온도 군별로 매월 30균주를 기준으로 하였고 8월부터 11월까지 60균주씩 분리하였다. 15°C에서 분리된 균주는 1월부터 4월까지 120균주였고, 35°C에서 분리된 균주는 1월부터 11월까지 450균주였다. 이중 24%인 8종 139균주가 동정되었고 종명은 *V. alginolyticus*(25균주), *V. parahaemolyticus*(53균주), *V. splendidus* biovar I(34균주), *V. splendidus* biovar II(12균주), *V. vulnificus*(2균주), *V. fluvi-alis*(3균주), *V. cholerae* non-O1(6균주), *V. salmonicida*(3균주) 및 *V. tubiashii*(3균주)이었다. 종별 생화학적 성상은 Table 1과 같았다.

*V. alginolyticus*는 TCBS에서 크고 불투명한 점액상의 황색 집락을 형성하였다. TCBS에서는 유주를 하지 않으나 1.6% 환천이 첨가된 brain heart infusion agar에서 유주하였다.

Indole, Voges-Proskauer, Simmon's citrate 양성하였고, methyl red 음성이었다. Lysine과 ornithine decarboxylase 양성, arginine dihydrolase 음성이었다. D-Glucose, sucrose, mannitol, maltose, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였다. 분리균들은 12% 염이 첨가된 배지에서 80%가 성장되었다. 4°C에서는 전균주가 성장하지 않았고, 42°C에서는 88%가 성장되었다. 4월중 19균주, 5월중 3균주, 9월중 1균주, 10월중 2균주가 분리되었다(Table 2).

항균제 내성을 시험한 결과 그 유형이 매우 다양하였다. 4균주가 8종의 항균제에 동시내성을 나타내었고, 나머지 20균주가 모두 3종 이상의 약제에 동시내성을 나타내었다(Table 3).

*V. parahaemolyticus*는 TCBS에서 투명한 녹색의 convex형 집락을 형성하였다. 1.6% 환천이 첨가된 brain heart infusion agar에서 유주하지 않았다. 일부 균주들은 Kligler iron agar에서 H₂S를 소량 생산하였다. Indole, methyl red, Simmon's citrate 양성이고 Voges-Proskauer에서 음성이었다. Lysine과 ornithine decarboxylase 양성하였고 arginine dihydrolase 음성이었다. D-glucose, mannitol, L-arabinose, maltose, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였다. 분리균들은 8%의 식염이 첨가된 배지에서 57%가 성장되었고 42°C에서 60%가 성장되었다. 월별로는 1월중 2균주, 5월중 21균주, 8월중 10균주, 9월중 11균주, 11월중 9균주가 분리되었다(Table 2). 5% 양의 적혈구가 첨가된 혈액한천배지에서 전균주가 용혈성을 나타내지 않았다.

일부의 균주(42균주)에 대하여 항균제 내성을 시험한 바 13균주가 6종이상의 항균제에 동시내성을 나타내었고 18균주는 3종 이상의 약제에 동시내성을 나타내었다(Table 3).

V. fluvialis 3균주가 8월에 분리되었다. Indole, Vogues-Proskauer가 음성이며 methyl red 및 단독탄소원인 citrate 이용능이 양성이었다. arginine dihydrolase 양성이었다. D-Glucose에서 gas를 생성하지 못하였고, 당에서 산생성능은 일반 sucrose 분해능을 가진 다른 비브리오패균과 유사하였다(Table 1). 0.5-5%의 염농도에서 잘 자라며 이 범위를 벗어나면 성장능력이 급격히 떨어졌다. 2균주가 4종 이상의 약제에 동시내성을 나타내었다.

*V. cholerae*는 8월에만 분리되었고 이들은 모두 식염이 첨가되지 않은 nutrient broth에서 잘 자랐다. TCBS에서 황색의 convex형 집락이 형성되었다. 운동성이 있었고 Kligler iron agar 상에서 H₂S를 생성하지 않았다. Indole, methyl red, Voges-Proskauer, Simmon's citrate 양성이었다. Lysine과 ornithine decarboxylase 양성하였고 arginine dihydrolase 음성이었다. D-glucose, sucrose, mannitol, maltose, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였다. 혈액한천배지상에서 강한 용혈반응을 나타내었다. Inaba, Ogawa 및 O139 항혈청에 응집되지 않았다. 2균주에 대하여 항균제 검사가 실시되었는데 1균주는 3종의 항균제에, 나머지 1균주는 7종의 항균제에 동시 내성을 나타내었다(Table 3).

*V. vulnificus*는 TCBS상에서 녹색의 투명한 집락을 형성하였고 indole과 methyl red 양성, Voges-Proskauer 음성, Simmon's citrate에서 단독탄소원으로 citrate를 이용하지 못하였고 lactose를 발효시키지 못하였다. 그러나 salicin에서 산을 생성하였고 용혈현상이 관찰되었다. 0.5-8% 염농도에서 성장되었고 15-42°C 사이에서 성장되었다(Table 1).

V. splendidus biovar I은 1월에 13주, 3월 9주, 4월 12주였다(table 2). Kligler iron agar에서 H₂S를 생성치 않았고, 암실에서 발광을 관찰할 수가 없었다. 0.5-5% 염이 첨가된 배지에서 잘 자랐고 이 범위를 벗어나면 성장이 저해되었다(Table 1). 온도 시험결과 대부분이 15°C에서만 성장하였으나 일부균주(6%)는 15-35°C에서 성장하였고 1월부터 4월사이에 분리되었다(Table 2). 대부분의 균주가 시험된 모든 항균제에 감수성을 나타냈고 용혈현상이 관찰되지 않았다.

V. splendidus biovar II는 모두 4월에 동정되었다. 그 성상은 sucrose에서 산을 생성시키지 못하는 것이 *V. splendidus* biovar I과의 유일한 차이점이었으며, 본 연구에서는 arginine dihydrolase 양성하였고 기타 다른 생화학적 성상은 전형적인 *V. splendidus* biovar II와 일치되는 3균주를 포함시켰다. 전균주가 15°C에서만 성장하였다(Table 1). 모든 항균제에 감수성을 나타내었고 용혈현상이 없었다.

V. tubiashii 1균주가 3월에 분리되었다. 이 균은 생화학적 성상이 *V. splendidus* biovar I과 매우 유사하며 다만 arginine dihydrolase 양성인 점이 다르다(Table 1). 모든 항균제에 감수성을 나타내었다.

*V. salmonicida*는 2월에 분리되었다. 이 균주는 생화학적 성상에서 indole, methyl red, Vogues-Proskauer 및 Simmon's citrate에서 *V. fluvialis*와 동일한 -+--+였으나, maltose에서 산을 생

Table 1. Characterization of vibrio isolates from the shellfish, Sunset shell (*Soletellina olivacea*)

Test	% Positive for Vibrio species								
	<i>V. alginolyticus</i> (25)	<i>V. parahaemolyticus</i> (53)	<i>V. fluvialis</i> (3)	<i>V. cholerae</i> (6)	<i>V. vulnificus</i> (2)	<i>V. splendidus</i> <i>biovar I</i> (34)	<i>V. splendidus</i> <i>biovar II</i> (12)	<i>V. salmonicida</i> (3)	<i>V. tubiashii</i> (1)
TCBS agar	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Green	Yellow
H ₂ S	0	47	0	0	0	0	0	0	0
Indole	100	100	0	100	100	100	100	0	100
Methyl-red	20	100	100	100	100	100	100	100	100
Voges-Proskauer	100	0	0	100	0	0	0	0	0
Citrate	100	100	100	100	0	100	100	100	100
Lysine decarboxylase	100	100	0	100	100	0	0	0	0
Arginine dihydrolase	0	0	100	0	0	0	25	0	100
Ornithine decarboxylase	100	85	0	100	100	0	0	0	0
Gas Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fermentation from									
D-Glucose	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Lactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrose	100	0	100	100	0	100	0	0	100
D-Mannitol	100	100	75	100	100	100	100	100	100
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salicin	0	0	75	0	100	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Sorbitol	0	0	50	0	0	0	0	0	0
L-Arabinose	0	89	100	0	0	0	0	0	0
Raffinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Rhamnose	0	32	0	0	0	0	0	0	0
Maltose	100	100	100	100	100	100			
100	0	0	100						
D-Xylose	4	2	0	0	0	0	0	0	0
Trehalose	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Cellobiose	76	91	25	0	100	100	100	0	100
β - hemolysis	0	0	100	100	100	0	0	0	0
Growth in NaCl (%)									
0	0	0	0	100	0	0	0	0	not tested
0.5	88	60	100	100	100	97	92	0	not tested
3	100	100	100	100	100	100	100	100	not tested
5	96	77	100	100	100	100	100	0	not tested
8	96	57	67	17	0	21	75	0	not tested
10	84	13	33	0	0	3	0	0	not tested
12	80	4	0	0	0	0	0	0	not tested
Growth at temperature (°C)									
4	0	8	100	33	0	0	0	0	not tested
15	88	58	100	50	100	100	100	100	not tested
35	100	100	100	100	100	6	0	0	not tested
42	88	60	100	100	100	0	0	0	not tested

성하지 못하였고 30°C 이상에서는 성장이 안되었으며 arginine dihydrolase 음성인 점에서 차이가 있었다 (Table 1). 3균주가 각각 다른 항균제 내성양상을 보였다 (Table 3).

고 찰

세균 분류의 어려움은 표현형을 기초로 한 인위 분류의 한계

Table 2. Isolated patterns of vibrios in the shellfish, Sunset shell (*Sole-tellina olivacea*)

Vibrio species	Month '97									
	1	2	3	4	5	8	9	10	11	
<i>V. alginolyticus</i>				19	3		1	2		
<i>V. parahaemolyticus</i>	2				21	10	11		9	
<i>V. fluvialis</i>						3				
<i>V. cholerae</i>						6				
<i>V. vulnificus</i>	2									
<i>V. splendidus</i> biovar I	13		9	12						
<i>V. splendidus</i> biovar II				12						
<i>V. salmonicida</i>		3								
<i>V. tubiashii</i>			1							

성 때문인데, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 DNA 서열의 비교와 같은 분자 수준에서의 접근도 모색되고 있지만 아직 만족할 수준에 이르지 못하고 있다(6, 12, 33, 37).

해양세균 비브리오는 아직까지도 속의 정의가 불안정한 상태로, 여러 차례에 걸쳐 다른 속들과 통합이 이루어졌고(7, 8, 22, 28), 종수준의 분류는 이보다 훨씬 복잡하여 세균이름의 승인된 목록 (Approved Lists of Bacterial Names) 이후에도 신종이 계속 추가되고 있다(36).

본 연구결과 얻어진 내용들을 고찰하면 다음과 같았다. 본 연구는 식용패류의 일종인 빛조개의 체내에서 서식하는 비브리오 종들의 파악과 계절에 따른 분리종의 변화상과, 특히 수온이 15°C 이하로 떨어지는 동절기에 조개 체내로부터 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 병원성 비브리오의 분리여부 및 이들이 자연계내에서 획득한 그람음성세균 치료약제에 대한 약제내성 양상등을 파악하는 것이 중요한 목적이었다. 배지조건과, 영양, 환경등 주어진 인위적인 인자들때문에 자연계에서 서식하고 있는 특정속의 세균을 완벽하게 분리하기는 쉽지않다. 본연구에서 분리된 비브리오의 세균상 역시 1차 비브리오 선별배지인 TCBS에서 집락형성이 가능한 균주들을 주 연구대상으로 하였다. TCBS배지는 현재까지 보고된 40여종의 비브리오가 모두 성장이 가능한 것은 아니지만 *V. cholerae*를 비롯한 인체 병원성 비브리오뿐만 아니라 많은 종류의 비브리오를 효과적으로 선별해 주기 때문에 폭넓게 비브리오 분리배지로서 이용되고 있기 때문이다(17).

*V. alginolyticus*는 해안에서 많이 분리된다고 보고되고 있지만 (9, 17, 21). *V. parahaemolyticus*만큼 잦은 빈도로 분리되지는 않는다. 기타 동정에서의 문제점(34) 등은 전보에서 상세하게 언급하였다(26).

일부 *V. parahaemolyticus*는 배양시간이 경과되면서 Kligler iron agar상에 H₂S를 약하게 생성하였다. Fujino(18)나 여러 문헌에서는 Kligler iron agar상에서 유화수소(H₂S)를 발생시키지 않는 것으로 보고되고 있지만(17) 국내에서는 유화수소(H₂S)를

Table 3. Antimicrobial drug resistance patterns of vibrio isolates

Vibrio species	Resistance pattern	Number of isolates	Total		
<i>V. alginolyticus</i>	AM NN K	1	24		
	AM CL CF	1			
	AM CL CF K	3			
	AM AN CF NN K	1			
	AM AN CL CF NN K	6			
	AM AN CL CF GM NN K	5			
	AM AN CL CF GM TE K	1			
	AM AN CL CF NN TE K	2			
	AM AN CL CF GM NN TE K	4			
	<i>V. parahaemolyticus</i>	CL		4	42
		AM CL		7	
		AM CF		1	
		CL CF		1	
		CL CF K		1	
AM AN CL		1			
AM CL CF		5			
AM AN CL CF		1			
AM AN CL K		1			
AM CL CF K		5			
AM AN CL CF K		1			
AM CL CM CF K		1			
AM AN CL CF K		1			
AM AN CL CF NN K		2			
AM AN CL CF NA K	2				
AM AN CL NA TE K	1				
AM AN CL CF TE K	3				
AM CL CF NN TE K	1				
AM AN CL CF NA TE K	2				
AM AN CL CF GM NN TE K	1				
<i>V. fluvialis</i>	CF K	1	3		
	AM CF TE K	1			
	AM CF NA NN TE K	1			
<i>V. cholerae</i>	AM CL	1	2		
	AM AN CL CF TE K	1			
<i>V. vulnificus</i>	AM	1	2		
	AM CF	1			
<i>V. splendidus</i> biovar I	K	12	34		
	AM	1			
	AN K	1			
	AM K	1			
	all sensitive	19			
<i>V. splendidus</i> biovar II	NN	1	12		
	all sensitive	11			
<i>V. salmonicida</i>	AN	1	3		
	AM	1			
	all sensitive	1			
<i>V. tubiashii</i>	all sensitive	1	1		

Abbreviations: Ampicillin (AM), Amikacin (AN), Cephalothin (CFg), Colistin (CL), Gentamicin (GM), Ka-namycin (K), Nalidixic Acid (NA), Tetracycline (Te), Tobramycin (NN)

발생하는 균주들이 해산물 등 자연환경과 환자들로부터 자주 분리되고 있다(25, 26). 그러나 RAPD-PCR을 통한 genomic DNA 분석뿐만 아니라, 기존의 생화학적 특성도 유화수소 생성 이외에는 모두 일치되기 때문에 이는 단지 생화학적 변이로 생각된다(19). *V. parahaemolyticus*는 수온이 15°C 이하에서는 성장이 안되는 것으로 알려져 있으며(13) 우리나라에서는 10월 이후로는 거의 분리가 되지 않지만 본 실험 장소와 동일지역인 다대포의 자주새우(*Crangon affinis*)로부터 2월에 분리되어 보고된 바가 있다(26). 본 실험에서 흑한기인 1월과 2월(다대포 해수온도 2-4°C) 빛조개로부터 분리된 결과와 이미 보고된 자주새우의 결과를 종합하여 볼 때, 이 균은 동절기에 이러한 저서생물의 체내에서 월동하고 있는 것으로 판단된다. 병원성 *V. parahaemolyticus*는 Kanagawa 현상을 일으키며 β -용혈능이 있는 것으로 보고되고 있지만, 우리나라의 경우, 자연계에서 분리되는 대부분의 균주들은 용혈능을 나타내지 않고 있다(25, 26).

*V. fluvialis*는 넙치 양식장의 병어체로부터 분리된 바가 있다(23). 그 후 우리나라의 자연계 환경에서는 보고된 일이 거의 없었다. 가장 중요한 생물학적 특성은 IMViC(indole -, methyl red +, Vogues-Proskauer -, Simmon's citrate +)이며, glucose로부터 gas의 생성 여부가 *V. furnissii*와 구분하는 분기점이 된다(10). 이 균은 Group F Vibrio, Group EF 6로 분류학적 위치가 *Aeromonas*와 *V. anguillarum*(*L. anguillarum*)의 중간정도로 생각되었으나(27) 분자분류학적인 연구결과 vibrio core group에서 멀리 떨어져 있는 것으로 밝혀졌다(6, 17, 29). Cellulose에서 산 생성능은 보고자에 따라 변화가 다소 있다(17). 종내 항혈청 변이는 18 O-antigen group으로 나뉘나 H antigen은 동일한 것으로 되어 있으며, 대부분이 설사환자(gastroenteritis)의 분변이나 또는 철새, 해수 등의 자연환경에서도 분리되며 간혹 사람에게 기회감염을 일으킨다(10, 35).

V. cholerae non-O1은 *V. cholerae* 다가항혈청과 *V. cholerae* O136 항혈청에 응집반응을 나타내지 않았다.

V. vulnificus(16)는 수온이 떨어지는 겨울에는 비배양상태(non-culturable dormant stage)로 되어 형태가 구형으로 전환되고 대사생리가 온도에 의해 달라지는 것으로 보고되었다(32). 이 균은 우리나라에서 패혈증 원인균으로 발병 후 전격적인 병의 진행 때문에 임상적으로 대단히 중요한 균이다. 서해안 전라도 지역의 뱀이 발달된 곳의 어패류에서 분리되며 자연계 환경에서는 분리하기가 쉽지 않은 균으로 알려져 있다(1, 2). 저자도 부산 지역을 기점으로 동해안과 남해안 일대의 자연계 내에서 원기재와 완전히 일치되는 균은 분리한 바가 없고, H₂S가 미량 생성되거나, 또는 생화학 특성이 일부 차이가 나는 *V. vulnificus*를 간혹 분리한 바가 있다. 균주에 따라 쥐를 치사시키는 경우와 그렇지 않은 경우가 있었으며 본 실험에서는 Simon's citrate에서 단독탄소원으로 citrate를 이용하지 못하고 lactose를 발효시키지 못하였지만 salicin에서 산을 생성하는 중요한 특성을 감안하여 *V. vulnificus*로 동정하였다. 분류학적으로 이 균은 biovar I과 biovar II로 나뉘어지고 biovar I이 전형적인 패혈증 원인균이고 biovar II는 인체에 질병을 일으키지 않고 뱀장어에게만 출혈성 궤양증을 일으키는 것으로 알려져 왔다. 그러나 biovar II

도 양만장 종사자에게 패혈증을 일으킨 예가 보고됨으로서, 주의할 요하는 균이다(5, 11). 대부분이 간장질환이나 알콜중독 등 선행성 질병력을 가진 이들에게 잘 발병된다(1).

*V. splendidus*는 겨울철에 우리나라 남해안 일대에서 가장 높은 빈도로 분리된 냉수성 비브리오이다. 전보에서도 상세하게 언급한 바와 같이 이 균의 중요한 특징인 발광현상이 관찰되지 않았지만(26) 조사된 나머지 생화학적 특성들은 기준주와 일치되었으며, 온도감수성은 보고자에 따라 다소 차이가 있어 37°C에서 성장하는 것도 있고 20°C 이하의 중저온에서 성장한다는 기록도 있지만(31) 우리나라의 경우 4월 이후 고수온기에서는 분리되지 않는다. 이와 생화학적 특성이 매우 유사한 균은 *V. tubiashii*이다.

*V. tubiashii*는 병든 쌍해각류로부터 처음 분리되었다(20). 우리나라에서는 부산 광안리 해수욕장에서 분리되어 보고되었다(24). *V. tubiashii*와 *V. splendidus*는 사람이나 어류에 병원균으로 보고된 바는 없으며, 원기재 발표 후 후속 연구가 상대적으로 부진한 비브리오에 속한다(17).

*V. salmonicida*는 노르웨이 등 스칸디나비아 반도에서 "Hitra disease" 병에 걸린 연어에서 처음 분리되었으며(15), *V. anguillarum*과 같은 어병균과의 분자생물학적 차이점 등에 대한 비교 연구도 이루어졌다(38). 우리나라에서는 자주 보고되고 있지 않다. 우점균으로 분리된 균주들을 계절별로 조사해보면, *V. parahaemolyticus*는 5월부터 9월까지 수온이 오르는 하절기에 분리되었고 *V. alginolyticus*는 4월과 5월, 즉, 계절이 봄에서 여름으로 바뀔 때 집중적으로 분리되었다. 냉수성 비브리오인 *V. splendidus*는 겨울과 봄에 걸쳐 분리되었고 특히 *V. splendidus* biovar II는 봄철에만 집중되었다.

본 연구 결과 얻어진 항균제 내성 양상은 매우 다양하였다. *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*에서 특히 다양하게 나타났지만 겨울철에 우리나라에서 많이 분리되는 *V. splendidus*는 거의 모든 항균제에 감수성을 나타내어 종간의 차이가 있었다. 일반적으로 항균제 내성결과는 분리하는 장소와 가검물에 따라 변동폭이 크며 *V. alginolyticus*가 보다 다양한 약제에 동시내성을 나타내었다. 비슷한 조건에서 살고 있는 자주새우(*Crangon affinis*)에서 얻어진 결과와 빛조개에서 분리된 균주를 비교하면 다음과 같았다(26).

자주새우와 빛조개에서 분리된 균의 종수는 비슷하였지만 그 내역과 빈도에 있어서는 차이를 보였다

자주새우의 경우 균의 종류는 *V. splendidus*의 biovar I, II를 한 종으로 취급할 경우 6종이 되며 빛조개에서는 8종으로 2종이 더 분리되었다. 자주새우에서 분리되었던 *L. damsela*, *V. harveyi*, *V. natriegens* 등은 본 실험에서 전혀 분리가 되지 않았고 대신 *V. cholerae* non-O1, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. salmonicida*, *V. tubiashii* 등이 빛조개에서만 분리되었다. 자주새우와 빛조개에서 공통으로 분리된 균주는 *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* 및 *V. splendidus* 등 3종의 비브리오였다. *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*가 우점종으로 분리된 것은 양쪽 결과가 같지만 자주새우에서는 *V. alginolyticus*가 *V. parahaemolyticus* 보다 2.5배정도 높게 분리되었을 뿐만 아니라

비교적 연중 고르게 분리되었다. 그러나 빛조개에서는 두종이 거의 같은 비율로 분리되었다. 그 외의 냉수성 비브리오들은 분리균주가 너무 적어서 *V. splendidus*를 제외하고는 *V. salmonicida*와 *V. tubiashii*의 경우는 항균제 시험이나 생존 한계온도의 시험 등에 대하여 의미를 부여하기가 어려웠다.

참고문헌

- 김신무. 1989. 한국에서 분리된 *Vibrio vulnificus*의 생물학적 성장과 혈청형에 관한 연구. 박사학위 청구논문. 조선대학교 대학원.
- 박석돈. 1996. 비브리오 블리피쿠스 감염증. 고려의학. p. 1-288.
- 柳鐘生. 1976. 원색한국패류도감. 일지사. p. 141.
- 주진우. 1983. 한국 남해안 일대의 장염 비브리오 분포 연구 - 제주, 거제, 남해, 육지 및 마산근해의 해수, 해저펄 및 해산물에서 장염비브리오 분리-. 대한미생물학회지 18, 1-9.
- Amaro, C., E.G. Biosca, B. Fouz, E. Alcide, and C. Esteve. 1995. Evidence that water transmit *Vibrio vulnificus* biovar 2 infections to eels. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1133-1137.
- Aznar, R., W. Ludwig, R.I. Amann, and K.H. Schleifer. 1994. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic vibrio species and whole cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 330-337.
- Baumann, P., L. Baumann, and M. Mandel. 1971. Taxonomy of marine bacteria; the genus *Beneckeia*. *J. Bacteriol.* 107, 268-294.
- Baumann, P., L. Baumann, S.S. Bang, and M.J. Woolkalis. 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr. Microbiol.* 4, 127-132.
- Baumann, P., A.L. Furniss, and J.V. Lee. 1984. Genus I. *Vibrio*, p. 518-538. In N.R. Krieg (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 1. The William & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Brenner, D.J., F.W. Hickman-Brenner, J.V. Lee, A.G. Steigerwalt, G.R. Fanning, D.G. Hollis, J.J. Farmer III, R.E. Weaver, S.W. Joseph, and R.J. Seidler. 1983. *Vibrio furnissii* (formerly Aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. *J. Clin. Microbiol.* 18, 816-824.
- Colman, S.S., D.M. Melanson, E.G. Biosca, and J.D. Oliver. 1996. Detection of *Vibrio vulnificus* biovar 1 and 2 in eel and oysters by PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1378-1382.
- Dorsch, M., D. Lane, and E. Stackebrandt. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based of 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 290-294.
- Dupray, E. and M. Cormier. 1983. Optimal enrichment time for isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from sea food. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1234-1235.
- Egidius, E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67, 15-28.
- Egidius, E., R. Wiik, K. Andersen, K.A. Hoff, and B. Hjeltness. 1986. *V. salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 518-520.
- Farmer, J.J. III. 1980. Revival of the name *Vibrio vulnificus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 656.
- Farmer, J.J. III and F.W. Hickman-Brenner. 1992. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. p. 2952-3011. In A. Balows (ed), *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, New York.
- Fujino, T., R. Sakazaki, and K. Tamura. 1974. Designation of the type strains of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24, 447-449.
- Ha, K.H. and H.K. Lee. 1999. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients and environmental sources by RAPD-PCR. *J. Korean Soc. Microbiol.* 34, 45-57.
- Hada, H.S., P.A. West, J.V. Lee, J. Stemmler, and R.R. Colwell. 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 1-4.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th ed., p. 260-289. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland, USA.
- International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae*: Minute of the meetings, 18 and 20 September 1990, Osaka, Japan. 1992. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 199-201.
- Lee, H.K., H.J. Kim, and I. Kim. 1991. Isolation of vibrio species from cultured flounders (*Paralichthys olivaceus*) with ulcers and ascites in the southern coast of Korea during the winter season. *Kor. Jour. Microbiol.* 29, 319-328.
- Lee, H.K. 1995. *Vibrio tubiashii*, isolated from Kwang-An beach in winter season. *J. Korean Soc. Microbiol.* 30, 603-609.
- Lee, H.K. 1996. The vibrios isolated from *Octopus variabilis*. *J. Korean Soc. Microbiol.* 31, 423-431.
- Lee, H.K. and S.S. Lee. 1997. Identification of the vibrios isolated from the shrimp (*Crangon affinis*) in estuary of Nakdong River in Korea. *J. Korean Soc. Microbiol.* 32, 529-537.
- Lee, J.V., P. Sheread, A.L. Furniss, and T.N. Bryant. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym group F vibrios, group EF6). *J. Appl. Bacteriol.* 50, 73-94.
- MacDonell, M.T. and R.R. Colwell. 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *System. Appl. Microbiol.* 6, 171-182.
- Mellado, E., E.R.B. Moore, J.J. Neito, and A. Ventosa. 1996. Analysis of 16s RNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains description of *Sabnivibrio costicola* gen. nov., com. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 817-821.
- NCCLS Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 1990. Fifth informational supplement. NCCLS document M100-S5. NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085, USA.
- Nealson, K.H., B. Wimpee, and C. Wimpee. 1993. Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminescent bacteria from the Persian Gulf and Kwait Region with the lux a probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2684-2689.
- Oliver, J.D., F. Hite, D. McDougald, N.L. Andon, and L.M. Simpson. 1995. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *V. vulnificus* in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2624-2630.
- Ruimy, R., V. Breitmayer, P. Elbaze, B. Safay, O. Bousse-mart, M. Gauthier, and R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 416-426.

34. Sakazaki, R. 1968. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biovar 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **21**, 359-362.
35. Shimada, T. and R. Sakazaki. 1983. Serological studies on *Vibrio fluvialis*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **36**, 315-323.
36. Skermaman, V.B.D., V. MacGowan, P.H.A. Sneath. 1989. Approved lists of bacterial names. American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.
37. West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Bryant, and R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 531-543.
38. Wiik, R. and E. Egidius. 1986. Genetic relationship of *Vibrio salmonicida* sp. nov. to other fish pathogenic vibrios. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 521-523.

(Received July 5, 1999/Accepted August 26, 1999)

ABSTRACT : Identification of the Vibrios Isolated from a Shellfish, Sunset Shell, (*Soletellina olivacea*)

Hun-Ku Lee (Department of Microbiology, Pukyung University, Pusan 608-737, Korea)

This study was conducted to investigate the vibrio flora in an edible shellfish, sunset shellfish, *Soletellina olivacea*, which were collected in the estuarine area, Dadaepo near Nakdong River in Korea from January 1997 to November 1997. Including five pathogenic vibrios (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non-O1, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio fluvialis*), a total of eight species of vibrios (*Vibrio splendidus* biovar I, *Vibrio splendidus* biovar II, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio tubiashii*) were identified from the sunset shellfish by their biochemical characters. The isolation of *Vibrio parahaemolyticus*, which is known not to grow below 15°C, in winter season indicates that the sunset shellfish is one of the natural overwintering hosts for *Vibrio parahaemolyticus*.