

국내 연안에서 분리한 *Vibrio vulnificus*의 특성

박근태 · 박민정¹ · 정초록² · 송춘복 · 이제희 · 여인규 · 전유진 · 허문수*

제주대학교 해양과학부, ¹국립보건원 장내세균과, ²한국생명공학원 세포생물실

Received November 5, 2004 / Accepted November 26, 2004

Characterization of *Vibrio vulnificus* Isolated from Domestic Coastal Area. Geun-Tae Park, Min Jung Park¹, Cho-Rok Jung², Choon-Bok Song, In-Kyu Yeo, Jehee Lee, You Jin Jeon and Moon-Soo Heo*. Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, ¹Laboratory of Enteric Infections, Department of Microbiology, NIH, ²Lab. of Cellular Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

- Five strains of *Vibrio vulnificus*, which cause serious septicemia in human worldwide, was isolated from marine environments of Korea costal area from May to July of 2002. The isolated strains were identified by API 20E kit and partial 16S rDNA sequence analysis. 16S rDNA sequence of the isolates showed 99% similarity with *V. vulnificus* ATCC 27562. The proteins of *V. vulnificus* isolates were examined by analyzing patterns of the cell lysates and outer membrane proteins (OMP). The OMP separated from cell lysates showed the common protein band. Therefore OMP profiles might be useful for the identification of *V. vulnificus* sp.

Key words – *Vibrio vulnificus*, 16s rDNA, Surface antigen, Outer membrane protein

*Vibrio vulnificus*는 하구의 기수 및 연안해역의 해수에 서식하는 해양세균으로 1976년 Hollis 등이 다른 *Vibrio* species와 구별되는 lactose-positive *Vibrio*라고 명명하였으며[11], 1979년 Farmer는 이 균의 *Vibrio*속과의 유전적인 관계, 표현형의 유사성에 근거를 두고 "*Vibrio vulnificus*"라고 명명하였다[7].

V. vulnificus 감염증은 1979년 Blake 등이 미국질병센터에 제출된 감염증 환자 39명의 자료를 역학적 특성과 임상증상에 따라 분석하여 원발성 패혈증군(primary septicemia group)과 상처 감염군(wound infection group)으로 분류하였다. 원발성 패혈증은 생선회, 굴, 피조개 등의 해산물을 비위생적인 처리에 의해 생식하였을 때 16~24시간 이후에 식중독과 같은 초기증세 이후 균이 혈액속으로 침입하여 생육, 증식함으로써 발병한다[2,20]. 패혈증은 해산물 생식 후 빠르면 3시간 늦으면 8일 이내에 전신증상이 나타나 증상발현 후 사망할 때까지 평균 4.2일이 소요되는 매우 빠른 경과를 보인다. 상처감염증은 원래 있던 상처부위나 벌레등에 물리면서 원인균에 오염된 바닷물에 접촉하거나 어패류를 손질중의 사소한 상처를 통하여 균이 침입하고 상처부위에 피사를 일으킨다. 평균 18%의 사망률로 원발성 패혈증보다는 낮지만 만성 질환이 있을 경우 속발성 패혈증으로 발전하기 쉽다[11,13].

V. vulnificus 감염증은 세계 각지에서 보고되고 있으며 국내는 1979년 전남 해안지방에서 피부 괴저병으로 사망한 환자의 원인균으로 처음 알려졌다. 이후 계속적으로 국내 해안으로부터 *V. vulnificus*가 분리되고 있으며 현재까지 매년 사

망자가 나타나고 있어 하절기의 중요한 보건 및 사회 문제로 대두되고 있다[12,13]. 우리나라의 사망률은 평균 62~79%로 매우 높게 나타나고 있으며 *V. vulnificus*에 감염되면 간 질환이 있는 사람이 간질환이 없는 사람에 비해 사망할 확률이 2.7배나 높은 것으로 보고되고 있다[4,5]. 그 외 당뇨병, 관절염, 결핵 등 만성질환이 있는 환자에서도 발생하여 만성병을 가진 사람들은 어패류를 생식하거나 바닷물과 접촉할 때 주의를 기울여야 한다.

본 균에 의한 질병은 근래 들어 증가하고 있으며 또한 치료시기가 늦어지면 사망률이 높게 나타나기 때문에 질병의 원인균인 *V. vulnificus*에 대한 신속한 검출방법이 요구되고 있으며 동정방법은 생화학적 검사를 통한 방법이 주류를 이루고 있다[13]. 그러나 해양이나 환자의 가검물로부터 얻어진 시료에서 바브리오속 검출용 배지인 thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS)를 사용하여 의심되는 집락을 얻은 후에 생화학검사를 실시하여 *V. vulnificus*를 확인하기까지 많은 시간과 경비가 소요되고 균주의 분리 조건에 따라 결과가 다르게 나올 수도 있다[14,10]. 따라서 PCR을 균의 동정과 검출을 용이하게 하는 수단으로 활용하고자 하여 *V. vulnificus*의 경우에도 hemolysin이나 cytolysin gene과 같은 virulence factor 유전자를 균의 동정 및 검출에 이용하려는 시도가 있었다[1,3,9]. 그러나 이러한 유전자는 균주들 간의 불안정성 및 유사성이 높아서 종 특이적인 동정에는 적합하지 못한 것으로 밝혀졌다. 그 이후 염기서열이 종 특이적으로 잘 보존되는 16S rRNA와 23S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 종간의 계통발생학적 거리를 규명하는 연구가 진행되어 많은 진척을 보이고 있다[15,16].

본 연구에서는 부산과 대천 근해의 해수 및 해저질과 해

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@cheju.ac.kr

산물을 시료로 하여 분리된 *V. vulnificus*를 생화학적 시험과 API 20E kit를 사용하여 동정하였고, 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 통하여 종간의 유연관계를 조사하였다. 또한 분리균주들의 단백질 발현을 cell lysate와 외막단백질의 SDS-PAGE를 통하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

대상균주의 분리

2002년 5월에서 7월까지 부산과 대천 해수욕장 일대의 해수 및 해조류를 포함한 해산물과 해저질을 채취하여 멸균된 증균용 배지(3%의 식염이 첨가된 펩톤수)에 일정량을 넣고 37°C에서 18~24시간 배양하였다. 상기 배양액으로부터 일정량을 취하여 TCBS (Difco, USA) 배지에 도말하고 37°C에서 18~24시간 배양 후 sucrose 비분해성으로 판단되는 직경 0.1~1 mm이내의 녹색집락을 분리하였다. 분리된 집락은 Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, USA) 한천 평판 배지에 옮겨 37°C에서 배양하면서 다음 실험에 사용하였다.

API 20E kit에 의한 동정

BHI 한천 배지에서 얻어진 콜로니를 생리식염수에 적정 농도로 현탁한 후 API 20E kit (Bio Merieux 20E, France)의 well에 각각 200 μ l씩 넣고 37°C에서 24시간 배양 후 API 20E kit manual에 따라 결과를 확인하였다.

16S rDNA analysis

1.5% NaCl이 첨가된 BHI broth 5 ml에 분리균주를 접종하여 26°C에서 200 rpm으로 24시간 배양한 후 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨 15000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 bacteria pellet을 수집하여 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리하여 template DNA로 사용하였고 DNA의 농도는 260 nM의 흡광도로 측정하였다. PCR primer는 procaryotic 16S rDNA universal primer인 27f (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG) 와 1522r (5'-AAGG-AGGTGATCCARCCGCA)을 사용하였다. PCR 반응은 bacterial genomic DNA 1 μ g을 주형으로 하여 100 pmole/ μ l농도의 primer를 각각 1 μ l씩 첨가하고 10 mM dNTPs 1 μ l와 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μ l로 맞추어 증폭하였다. 증폭 과정은 pre-denaturation 94°C 5분, denaturation 94°C 1분, annealing 54°C 1분, extension 72°C 1분의 반응을 30회 실시하였고, 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA)를 maker로 사용하여 1.7% agarose gel 전기영동으로 크기를 확인 하였다. 분리된 PCR 반응산물은

TOPO™TA Cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 클로닝을 실시하였다. 분리된 DNA와 vector를 혼합한 후 5분간 반응시키고 One Shot™ Competent cell과 혼합하여 얼음에 20분간 처리하였다. 42°C에서 30초간 반응시킨 후 SOC 액체 배지 250 μ l을 넣고 37°C, 30분간 진탕 배양하였다. X-gal 40 μ l을 첨가한 LB 고체배지(Luria Bartani, 50 μ g/ml ampicillin)에 37°C 24시간 배양 후 흰색 콜로니를 분리하여 LB 액체배지에서 37°C, 12시간 배양하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 16,000×g 에서 1분간 원심분리하여 bacteria cell을 모은 후 AccuPrep™ plasmid extraction kit (Bioneer)을 이용하여 Plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid를 (주)마코젠에 의뢰하여 염기서열을 결정하였고 결정된 염기서열은 NCBI의 Blast search를 통하여 동정을 실시하였다. 또한 분리균주들의 16S rDNA sequence와 참조균주 및 관련 *Vibrio*속의 rDNA sequence를 Clustal W로 multiple alignment를 수행하였고 Neighbor-Joining법을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

분리균주의 단백질 발현 특성

1) Cell lysates의 제조

균체를 TEAN (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM sodium azide, 0.2 M NaCl, pH 7.5)의 완충액에 현탁시키고 초음파 파쇄기로 파쇄하였다. 4,500×g로 20분간 원심분리한 후 상청액을 cell lysate fraction으로 사용하였다. Cell lysates에 포함된 단백질량은 Bradford assay[3]로 정량하였고 SDS-PAGE를 수행하여 whole cell의 단백질 패턴을 분석하였다.

2) 외막단백질의 분석

Filip 등의 방법으로[9] 외막단백질을 추출해 내어 SDS-PAGE로 분석하였다[8]. 균체를 상기의 방법으로 파쇄한 후 얻어진 상청액을 50,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 막 침전물과 상청액의 원형질 단백질을 분리하였다. 침전물을 1% sodium lauroyl sarcosine이 첨가된 TEAN 완충액에 현탁시켜 37°C에서 30분간 방치한 후 100,000×g에서 1시간동안 원심분리하여 용해성 내막 분획(inner membrane fraction)과 불용성 외막분획(insoluble outer membrane fraction)을 분리하였다. 외막분획을 TEAN 완충액에 현탁하고, Bradford 법으로 정량한 후 SDS-PAGE를 실시하였다[3].

결과 및 고찰

분리균주의 분리 및 생화학적 검사

분리시료는 2002년 5월에서 7월 사이 부산과 대천 해수욕장 일대의 해수 및 해저질, 해산물을 대상으로 하였고 이들 시료를 증균용 배지에서 증균한 후 TCBS 배지에 도말하여 녹색의 작은 콜로니를 취하여 API 20E kit의 검사를 실시한

Table 1. Biochemical characteristics of *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and environmental isolates by API 20E kit

Test	score	Strains tested											
		Reference strain ^{a)}	DDP-1	DDP-2	DDP-3	DCH-4	DCH-5	Para ^{b)}					
ONPG ^{e)}	1	+	+	+	+	+	+	+	-				
ADH	2	- 5	- 5	- 5	- 5	- 5	- 5	- 5	- 4				
LDC	4	+	+	+	+	+	+	+	+				
ODC	1	+	-	-	-	+	-	-	+				
CIT	2	+	3	+	2	- 0	+	2	- 1	+	2	+	3
H ₂ S	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	2	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4
IND	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	2	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6
GLU	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	2	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1
SOR	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	2	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
MEL	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	2	+	7	-	5	-	5	-	5	-	5	-	5
OX	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
total score		5346107 ^{c)} -98.7% ^{d)}	5146105 -93.7%	5046105 -89.4%	5246105 -93.7%	5146105 -93.7%	5246105 -93.7%	4346104 -93.8%					

a) *V. vulnificus* ATCC 27562, b) *V. parahaemolyticus*, c) API count in index, d) % accuracy, e) Abbreviation: ONPG; orthnitrophenyl-β-D-galactosidase, ADH; arginine dehydrogenase, LDC; lysine decarboxylase, ODC; ornithine decarboxylase, CIT; citrate utilization, H₂S; H₂S production, URE; urease, TDA; tryptophane deaminase, IND; indole production, VP; Voges-Proskauer, GEL; gelatinase, GLU; glucose utilization, MAN; manitol utilization, INO; inositol utilization, SOR; sorbitol utilization, RHA; rhamnose utilization, SAC; sucrose utilization, AMY; amylase, ARA; arabinose utilization, OX; cytochrome oxidase.

결과 분리된 균주 중 다대포의 2균주와 대천의 1균주가 *V. vulnificus*일 확률은 93.7%였고, 다른 대천의 1균주는 91.5%, 다대포의 1균주는 89.4%로 나타났다(Table 1). 부산에서는 송정해수욕장과 서남해안의 특징을 나타내는 다대포해수욕장에서 분리 실험이 진행되었으나 송정해수욕장에서는 *V. vulnificus*가 분리되지 않았고 다대포에서는 25개의 분리균주 중 3개 균주가 *V. vulnificus*로 판정되었다. 서해안 대천 지역은 총 26균주의 분리균주 중 2개 균주가 *V. vulnificus*로 판정되었다. *V. vulnificus*에 의한 패혈증은 우리나라의 매년 여름철 특히 해수온도가 18.5~26.3°C 사이인 6-10월 사이에 환자가 집중적으로 발생한다[5,15]. 특히 *V. vulnificus*는 염도가 비교적 낮은 강 하구에 많이 분포하므로 우리나라의 경우 남, 서해안지방의 환자 발생률이 동해안 지역의 10배가 넘는 것으로 보고되고 있고 본 연구에서도 부산해역에서도 낙동강 하구지역인 다대포에서는 *V. vulnificus*로 판정된 균주가 분리되었지만 동해안의 특성을 지닌 송정해역에서는 발견되지 않았다[20].

16S rDNA 염기서열에 의한 분석

*V. vulnificus*로 동정된 분리 균주의 genomic DNA를 주형으로 하여 진정세균의 universal primer를 사용하여 PCR를 수행 반응산물을 얻었고 전기영동을 실시하여 1.5 kb 정도의 전기영동 산물을 얻을 수 있었다. 본 분리균주들의 16S rDNA 염기서열분석 결과 표준균주인 *V. vulnificus* ATCC 27562와 99% 일치하였다. 또한 *Vibrio*속의 다른 균주들과 분리균주들의 염기서열을 이용한 phylogenetic tree는 Fig. 1과 같으며 대천에서 분리된 2균주 DCH 1, 2 및 다대포 분리 균주인 DDP3는 대조균주와 거의 일치하였으며 다대포에서 분리된 DDP1, 2 균주는 대천의 분리균주와는 약간의 차이를 보였다. 염기서열 분석결과와 API kit 성장들에 의한 동정결과는 일치하였다. 16S rRNA 유전자는 염기서열이 종 특이적으로 잘 보존되어 있어 *V. vulnificus*외에도 다른 *Vibrio*종간의 확인에도 유용하게 사용될 수 있으며 Dorsh 등은 *V. vulnificus*의 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 *V. vulnificus*는 다른 비브리오종들과 상당한 거리를 나타내는 *Vibrio*

*anguillarum*과 상동성이 큰 것으로 보고하였다[17,18]. 본 연구결과 역시 분리균주들은 대조균주와 높은 상동성을 가지면서 *Vibrio anguillarum*과는 다른 *Vibrio*속의 균주들보다 유연관계가 높은 것을 확인할 수 있었다.

분리균주의 단백질 발현 특성

*V. vulnificus*를 검출하기 위한 방법들로는 증균배지에 증식시킨 후 선택배지에 도말하여 특징적인 집락을 취하여 각종 생화학 검사를 실시하는 방법이 보편적으로 사용되고 있으며 그 외에 16S rRNA, 23S rRNA 유전자의 염기서열 또는 cytotoxin-hemolysin 유전자의 염기서열 결정법과 항혈청을 사용하는 immunoassay, 표면항원의 분석 등이 있다[17-19].

본 실험에서는 *V. vulnificus*에 특이적인 외막단백질을 탐색하고 이를 이용한 균주 검출 방법을 개발하기 위하여 표준균주로 사용된 *V. vulnificus* ATCC 27562와 해양에서 분리한 균주들의 외막단백질의 발현을 비교분석하였다. 또한 외막단백질과 cell lysates의 비교를 위하여 분리균주와 표준균주들을 과쇄하여 얻어진 cell lysates의 단백질 전기영동을 실시하였다. 35 kDa에서 표준균주와 DDP-1, DCH-2 및 DCH-3에서 유사 단백질 밴드가 확인되었으나 DDP-3 및 DCH-1에서는 밴드가 확인되지 않았으며 전체적인 단백질 밴드는 많은 차이를 보여 cell lysate를 이용한 *Vibrio vulnificus*의 검출방법에는 적합하지 않았다(Fig. 2). 외막단백질만을 분리하여 전기영동으로 분석한 결과 *V. vulnificus* 표준균주 및 분리균주

들은 40 kDa 부근에서 공통 단백질 밴드를 확인할 수 있었으나 *V. parahaemolyticus*는 40 kDa 근처에서 발견되는 단백질 분자량이 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 분리균주의 신속한 동정과 검출을 위해 종 특이적인 유전자의 증폭, RFLP등의 많은 연구 보고가 이루어지고 있으며 또한 특이적인 표면항원을 탐색하여 ELISA와 Western blotting과 같은 면역학적 방법으로 다른 균주와의 pattern을 비교 분석하여 동정하는 방법의 연구도 진행되고 있다[19]. 본 실험에서도 종 특이적인 외막단백질을 분리, 정제하여 이에 대한 항체로써 균주를 분리 및 동정할 수 있는 면역학적 방법에만 따른 동정을 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다. Cell lysates를 분리하여 표준균주로 사용된 *V. vulnificus* ATCC 27562와 해양에서 분리한 균주들을 비교한 결과 표준 균주와 분리균주 사이에서의 단백질 패턴은 차이가 많았다. 그러나

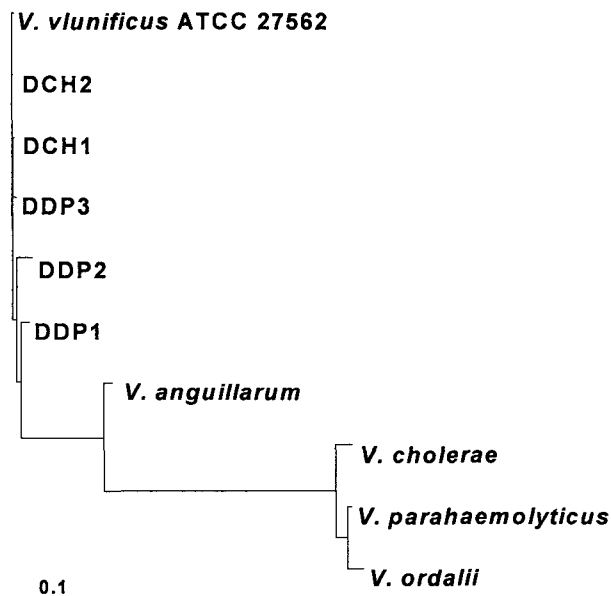


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence analysis showing the position of isolates(1000 bootstrap for the confidence level). The tree shows the relationship between representative species of the genus *Vibrio* and isolates. The scale bar indicates 1 nucleotide substitution per 100 nucleotide positions.

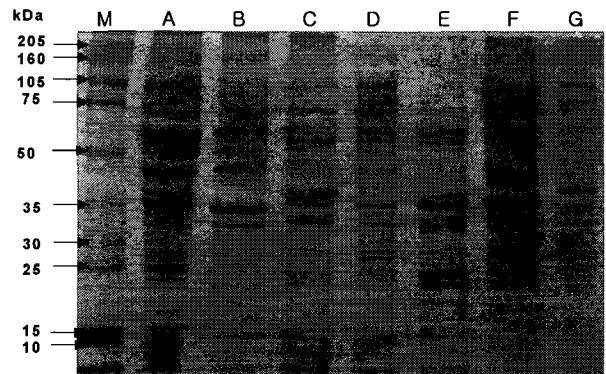


Fig. 2. SDS-PAGE profile of cell lysates from *V. vulnificus* and isolates. Lane M; Molecular weight markers (Amersham, Full Range Rainbow) lane A; *V. vulnificus* ATCC 27562, lane B; DDP-1, lane C; DDP-2, lane D; DDP-3, lane E; DCH-1, lane F; DCH-2, lane G; *V. parahaemolyticus*.

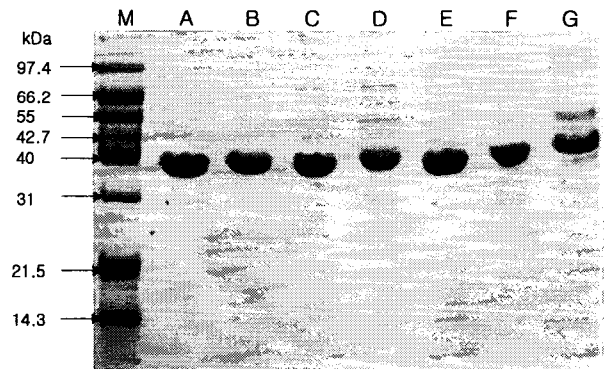


Fig. 3. SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins from *V. vulnificus* and isolates. Lane M; Molecular weight marker (Promega mid range)lane A; *V. vulnificus* ATCC 27562, lane B; DDP-1, lane C; DDP-2, lane D; DDP-3, lane E; DCH-1, lane F; DCH-2, lane G; *V. parahaemolyticus*.

외막단백질 발현 양상에서는 공통의 단백밴드를 확인할 수 있었으며 이를 이용한 종 특이적 항원에 대한 연구가 진행된다면 신속진단법에 개발에 응용이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

2002년 5월에서 7월사이 한국 근해로부터 총 가검물 50례 중에서 *V. vulnificus*은 5균주가 분리되었고, API 20E kit의 동정률이 89.4~93.7%로 나타났다. *V. vulnificus* 16S rDNA를 증폭하여 얻은 산물을 cloning하여 염기서열을 결정하고 분석한 결과 *V. vulnificus*로 확인되었다. 동정된 분리균주들의 cell lysates을 SDS-PAGE로 분석하였고 표준균주로 사용된 *V. vulnificus* ATCC 27562와 분리 균주들을 비교해 본 결과 단백밴드pattern이 많은 차이를 보였으나 외막단백질은 *V. vulnificus*간에는 공통의 밴드가 확인되었으나 *V. parahaemolyticus*와는 차이를 보였다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 제주대학교 학술연구비에 의해 연구되었음.

참 고 문 헌

- Arias, C. R., E. Garay and R. Aznar. 1995. Nested PCR method for rapid sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediment, and water. *Appl Environ. Microbiol.* **61**, 3476-3578.
- Blake, P. A. 1984. Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J. Infec. Dis.* **149**, 558-600.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brauns, L. A., M. C. Hudson and J. D. Oliver. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl Environ. Microbiol.* **57**, 2651-2655.
- Chung, Y. M., S. Y. Lee, K. S. Kim and S. I. Lee. 1982. *Vibrio vulnificus* septicemia in patient with liver cirrhosis. *Yonsei Med. J.* **23**, 146-152.
- Chin, K. P., M. A. Lowe and M. J. Tong. 1987. *Vibrio vulnificus* infection after raw oyster ingestion in a patient with liver disease and acquired immune deficiency syndrome-related complex. *Gastroenterology* **92**, 796-799.
- Dilip, K., S., Tapas K. Sengupta and A.C. Ghose. 1992. Major outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* and their role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization. *Infect. Immun.* **60**, 4848-4855.
- Farmer, J. J. 1980. Revival of the name *Vibrio vulnificus*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **30**, 656-661.
- Filip, C. G., Fletcher, J. L. Wulff and C. F. Earhart. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent: sodium lauroyl sarcosinate. *J. Bacteriol.* **15**, 171-177.
- Hill, W.E., S. P. Keasler and M. W. Trucksess. 1991. PCR identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 707-711.
- Hollis, D. G., R. E. Weaver and C. N. Baker. 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **3**, 425-431.
- Hur, M. K. 1986. Report of case of *Vibrio vulnificus* isolated from wound infection Korean. *J. Clin. Path.* **6**, 69-75.
- Ju, J. W., K. S. Kim, M. S. Heo and C. R. Jung. 1998. Isolation of detection of *Vibrio vulnificus* from the southern sea of Korea for the prevention of *V. vulnificus* infection. *J. Korean Soc. Microbiol.* **33**, 361-371.
- Ju, J. W., K. S. Kim, S. J. Park, S. O. Yoon and C. R. Jung. 1998. Identification of *Vibrio vulnificus* in Pusan and southern sea of Korea in 1996 using API 20E kit. *J. Korean Soc. Microbiol.* **33**, 187-194.
- Kim, J. J., K. J. Yoon, H. S. Yoon, Y. Chong, S. Y. Lee, C. Y. Chon and I. S. Park. 1986. *Vibrio vulnificus* septicemia: Report of four cases. *Yonsei med. J.* **27**, 307-310.
- Kumiko, K. T. 1993. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **43**, 8-19.
- McPherson, V. L., J. A. Watts and L. M. Simpson. 1991. Physiological effects of the lipopolysaccharide of *Vibrio vulnificus* on mice and rats. *Microbios* **67**, 141-149.
- Dorsh, M., D. Lane and E. Stackebrandt. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **42**, 58-63.
- Heo, M. S and C. R. Jung. 1998. PCR and restriction fragment pattern of 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus*. *Korean J. of Life Sci.* **8**, 126-130.
- Park, S. D. 1996. *Infection of Vibrio vulnificus*. pp. 159-264, Korea medical Book Publisher Co., Seoul.