

전남 다도해 바다목장 비브리오속 세균의 계절적 분포

김말남[†] · 이한웅
상명대학교 생물학과

Seasonal Distribution of *Vibrio* spp. in the Jeonam Archipelago Marine Ranching Ground

Mal Nam Kim[†] and Han Woong Lee

Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

Cell number of *Vibrio* spp. was examined for the surface and bottom sea water harvested from the 9 stations in the Jeonam Archipelago Marine Ranching Ground in 2006~2007. Species population composition and dominant species were analyzed as well. The largest number of *Vibrio* spp. was detected in summer (June, 2007) among the 4 seasons with the surface and bottom sea water samples of 5.4~93.2 cfu · mL⁻¹ and 1.0~53.1 cfu · mL⁻¹, respectively. In winter (January, 2007), *Vibrio* spp. was not detected at all except that one station from which 0.2 cfu · mL⁻¹ of *Vibrio* spp. was counted in the surface sea water sample. Cell numbers were 0~11.9 cfu · mL⁻¹ and 0~8.3 cfu · mL⁻¹, respectively, in the surface and bottom sea water samples retrieved in spring (April, 2007), and the corresponding sea water samples in autumn (November, 2006) were contaminated with 0.1~21.4 cfu · mL⁻¹ and 0~2.9 cfu · mL⁻¹, respectively. Species population composition of *Vibrio* spp. was found to be *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *V. cholerae* non-01 among which *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* were dominant in all seasons. *V. alginolyticus* was detected from all stations even in the winter season indicating that this species seems to be less temperature dependent than the other *Vibrio* spp..

Key words: Jeonam Archipelago Marine Ranching Ground, *Vibrio* spp., Cell number of *Vibrio* spp., Species composition, Dominant species

서론

그람음성이며 호염성 간균인 비브리오속 세균은 해수 및 기수 지역에 널리 분포하는 상재세균으로(Raghunath *et al.*, 2007), 어패류, 갑각류, 연체동물 등 다양한 수산물 또는 인체에 질병을 유발할 수 있다(Kim *et al.*, 2005; Baffone *et al.*, 2005). 비브리오속 세균에서 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus* 및 *V.*

*fluvialis*가 대표적 병원성 균종으로 보고되어 있다(Kang *et al.*, 2003; Son *et al.*, 2005; Nhung *et al.*, 2007). 병원성 비브리오속 세균에 의한 인체 감염은 주로 6~8월의 여름철 고 수온기에 많이 발생하며 (Thompson *et al.*, 2006), 감염경로는 피부를 통한 창상감염도 일부 있으나 대부분은 이균에 오염된 어패류의 생식에 의한 경구감염이다. 따라서 비브리오속 세균 감염에 의한 양식 어류의 경제적 손실을 방지할 뿐만 아니라, 해

[†]Corresponding Author : Mal Nam Kim, Tel : 02-2287-5150,
Fax :02-2287-0070, E-mail : mnkim@smu.ac.kr

산물을 다량 섭취하고 생선회와 같은 어패류의 생식을 즐기는 우리나라 국민의 식품 위생과 생태계 안전성을 높이기 위하여 해양환경에서 병원성 비브리오속 세균에 대한 지속적이고 정기적인 관리가 필요하다(Byun *et al.*, 2005).

본 연구에서는 어족의 번식에 알맞은 해양환경을 가진 전남 다도해 바다목장을 대상으로 병원미생물 측면에서 전남 다도해 바다목장의 병원성 비브리오속 세균을 파악하기 위하여 계절별 비브리오속 세균의 개체수를 측정하고 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus* 및 *V. fluvialis*의 검출 여부를 종 동정을 통하여 확인하여 비브리오속 세균 군집의 종조성과 우점종을 분석하였다.

재료 및 방법

해수 채취시기 및 조사정점

2006년 11월, 2007년 1월, 4월 및 6월 전남 다도해 바다목장 내 9개 정점(Fig. 1)의 표층과 저층 해수를 van Dorn water sampler를 사용하여 채수하였다.

비브리오속 세균의 개체수 측정

Eddy and Jones(2002) 및 Hijarrubia *et al.*(1996)의 방법에 따라 해수시료를 thiosulfate citrate bile sucrose(TCBS)평판배지에 배양 후 노란색 또는 초록색 콜로니를 선별하여 평판계수법으로 개

체수를 측정하였다.

비브리오속 세균의 동정 및 우점종 분석

실험결과와 신뢰도 확보를 위하여 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 비브리오속 세균의 표준균주를 함께 실험하여 결과를 비교하였다.

Bacteriological Analytical Manual(2004)에 따라 해수시료를 여과하고 alkaline peptone water (APW)에서 증균배양 후 TCBS 평판배지에서 배양하여 생성된 콜로니를 선별하여 순수분리 배양하여 genomic DNA를 추출하고 polymerase chain reaction, (PCR)을 이용하여 분자 생물학적 동정 기법으로 확인하였다.

V. parahaemolyticus, *V. vulnificus* 및 *V. cholerae*

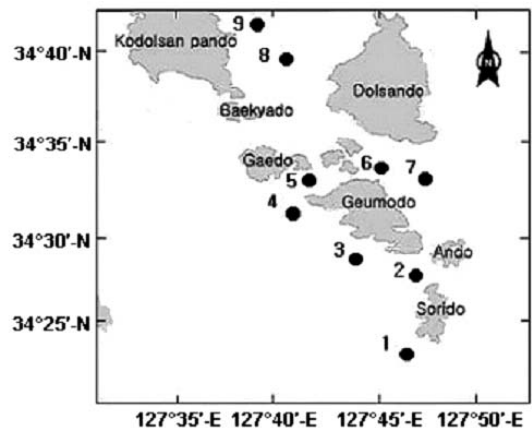


Fig. 1. Sampling stations in the Jeonnam Archipelago Marine Ranching Ground

Table 1. Species specific primers for the multiplex PCR

Strain	Primer sequences	Size (kb)
<i>V. parahaemolyticus</i>	F*-TLH: 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3'	0.45
	R**-TLH: 5'-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3'	
<i>V. vulnificus</i>	F-VVH: 5'-TTCCAACCTCAAACCGAACTATGAC-3'	0.205
	R-VVH: 5'-ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG-3'	
<i>V. cholerae</i>	F-TOXR: 5'-CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC-3'	0.779
	R-TOXR: 5'-AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG-3'	

F*, forward primer; R**, reverse primer

의 검출은 Panicker *et al.*(2004)의 방법에 따라 종 특이 프라이머(Table 1)를 이용하여 multiplex PCR하였다. PCR 산물은 agarose gel에 전기영동으로 분리하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 하에서 분석하였다.

한편, 종 특이 프라이머가 제작되어 있지 않은 *V. alginolyticus*와 multiplex PCR의 annealing조건이 Panicker *et al.*(2004)과 일치하지 않는 *V. fluvialis*는 16S~23S rDNA IGS 염기서열을 분석하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST N program으로 Genbank에 등록되어 있는 염기서열과 비교·분석하였다. *V. alginolyticus*와 *V. fluvialis*의 검출을 위하여 IGS-PCR에 사용한 프라이머는 Lee *et al.*(2002)의 방법에 따라 16/23S-F 5'-TTGTACACACCGC-CCGTC-3'와 16/23S-R 5'-CCTTTC- CCTCACG-GTACTG-3'이며, PCR 산물은 agarose gel에 전기영동하여 분석하였다.

결과 및 고찰

비브리오속 세균의 개체수 측정

2006년 11월, 2007년 1월, 4월 및 6월 전남 다도해 바다목장 내 비브리오속 세균의 개체수를

측정하였다. Fig. 2와 3은 채수 시기와 위치(표층 및 저층) 및 정점에 따른 비브리오속 세균의 개체수를 나타낸 것이다. 표층수의 수온 분포는 2006년 11월 16~17°C, 2007년 1월 8~11°C, 2007년 4월 12~14°C 그리고 2007년 6월에는 19~23°C이었으며, 저층수의 수온은 2006년 11월 15~16°C, 2007년 1월 8~11°C, 2007년 4월 12~15°C 그리고 2007년 6월에는 18~22°C로 조사되었다. 따라서 채수 시기가 동일한 경우 표층과 저층 간 수온의 차이는 크지 않다고 할 수 있다.

9개 조사정점에서 비브리오속 세균의 계절별 개체수 분포는 봄과 가을에 비하여 해수온도가 높은 여름(2007년 6월)에 더 많이 검출되어 표층수와 저층수에서 각각 5.4~93.2 cfu · ml⁻¹ 및 1.0~53.1 cfu · ml⁻¹의 비브리오속 세균이 검출되었다. 해수온도가 가장 낮은 겨울(2007년 1월)에는 정점 8의 표층수에서만 0.2 cfu · ml⁻¹의 비브리오속 세균이 검출되었을 뿐 다른 정점에서는 비브리오속 세균이 전혀 검출되지 않았다. 봄(2007년 4월)에는 9개 조사정점의 표층수와 저층수에 각각 0~11.9 cfu · ml⁻¹ 및 0~8.3 cfu · ml⁻¹의 비브리오속 세균이 서식하고 있었으며, 가을(2006년 11월)의 경우 표층수와 저층수에서

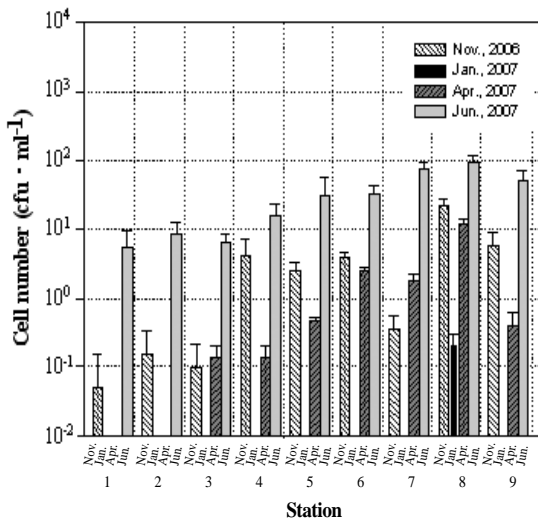


Fig. 2. Cell number of *Vibrio* spp. isolated from the Jeonam Archipelago Marine Ranching Ground surface sea waters

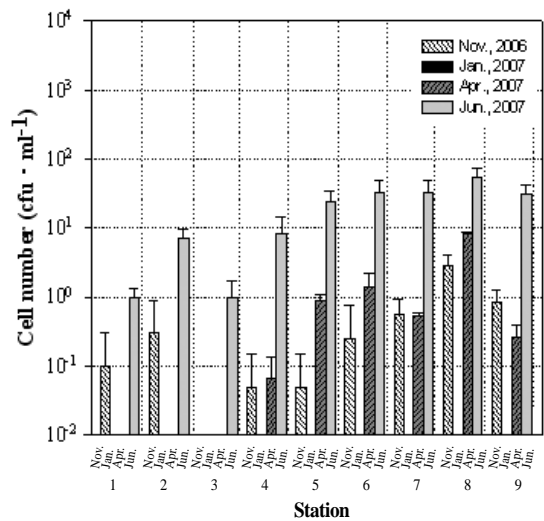


Fig. 3. Cell number of *Vibrio* spp. isolated from the Jeonam Archipelago Marine Ranching Ground bottom sea waters

각각 $0.1\sim 21.4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 및 $0\sim 2.9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 가 검출되었다.

Su and Liu(2007)도 비브리오속 세균의 개체수가 해수온도와 밀접한 관련을 나타낸다고 하였으며, Lee *et al.*(2007)은 어패류로부터 계절별로 *V. parahaemolyticus*를 분리하였을 때 수온이 낮은 겨울(12월~3월)에는 분리되지 않거나 분리가 매우 낮은 반면, 수온이 가장 높은 8월에는 많이 분리되었다고 보고하였다. Choi and Tak(1991)도 동해안 강구지역에서 해수 수온이 12°C 이하로 내려가는 겨울에는 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*가 검출되지 않았으나 수온이 14°C 이상으로 상승하는 계절부터는 이 균들이 분리되었다고 보고하였다.

전남 다도해 바다목장에서 비브리오속 세균의 개체수도 수온이 가장 높은 여름철에 가장 많이 검출되었으며 해수의 온도가 낮아질수록 적게 검출되어 비브리오속 세균은 계절 변화에 따른 해수온도의 변화에 가장 큰 영향을 받는 것으로 조사되었다.

Kang(2003)은 2001년 6월부터 2002년 5월까지 제주도 념치양식장 양식 해수에서 $2.8\sim 105.0 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 비브리오속 세균을 검출하였으며, Jung and Shin(1996)은 1992년 8월 여수 및 동중국해의 내만에서 $0.2 \times 10^2\sim 9.0 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 외양에서 $0.1 \times 10^1\sim 1.1 \times 10^1 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 이 검출되었다고 보고하였다. Shin *et al.*(1992)은 비브리오속

세균이 1~5월의 여수 가막만에서 전혀 검출되지 않았으나 7~9월에는 $5.0 \times 10^1\sim 1.7 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 이 검출되었다고 보고하였다. 한편 Eddy and Jones(2002)는 미국 Great-Bay 치어양식장 해수에서 $1.8 \times 10^3\sim 6.0 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, Stabili *et al.*(2005)는 이태리 북구 Ionion연안 해수 및 패류에서 $0.7 \times 10^1 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 비브리오속 세균의 검출을 보고하였다. 따라서 비브리오속 세균의 개체수는 계절에 따른 수온변화와 외양수 및 패류의 영향을 받을 뿐만 아니라 일반 해수와 양식용 해수 등 서식환경 및 분리원에 따라서도 영향을 받는다고 할 수 있다.

비브리오속 세균의 동정 및 우점종 분석

Fig. 4는 본 바다목장의 표층수와 저층수에서 분리된 비브리오속 세균의 genomic DNA를 추출하여 multiplex PCR을 수행한 후 전기영동한 결과이다. *V. parahaemolyticus*는 4계절 모두 검출되었으며, KCCM에서 분양받은 표준균주 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802(Fig. 4의 lane 1)와 계절별로 표층수 및 저층수에서 분리된 균주는 모두 동일한 위치(450 bp)에서 표적 밴드를 나타내어 Bej *et al.*(1999)과 Panicker *et al.*(2004)이 450 bp 위치에서 *V. parahaemolyticus*의 표적 밴드를 보고한 것과 동일한 결과를 얻었다.

2007년 1월 표층수에서 분리된 균주는 multiplex PCR 결과에서 표준균주 *V. cholerae* ATCC

Table 2. Species population composition of *Vibrio* spp. in the sea water samples of the Jeonam Archipelago Marine Ranching Ground

Sampling date	Nov., 2006		Jan., 2007		Apr., 2007		Jun., 2007	
	S*	B**	S	B	S	B	S	B
<i>V. parahaemolyticus</i>	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>V. vulnificus</i>								
<i>V. cholerae</i> non-01			○					
<i>V. alginolyticus</i>	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>V. fluvialis</i>								

S*, Surface sea water; B**, Bottom sea water

25920과 동일한 위치(780 bp)에서 표적 밴드를 나타내었고 콜레라 진단용 혈청실험에서 비 전염성 *V. cholerae* non-01으로 판명되었다(Fig. 4).

Fig. 5는 표준균주 *V. alginolyticus* ATCC17749 및 본 바다목장의 표층수와 저층수에서 검출된 *V. alginolyticus*의 16S~23S rDNA IGS-PCR 전기영동 결과이며 Lee *et al.*(2002)의 방법에 따라 *V. alginolyticus* 표준균주의 PCR 밴드 패턴을 분석하였을 때 1,000~1,500 bp 위치에서 2개의 minor 밴드(Fig. 5의 lane 1의 a)와 900~1,000 bp 위치에서 major 밴드 1개를 형성하는 것이 확인되었고 이들 밴드 패턴은 본 바다목장의 분리균주에서도 동일하게 나타났다. 그리하여 전기영동상에

나타난 바다목장 분리균주들의 major 밴드 1개씩을 QIAquick® gel extraction kit(Qiagen)로 각각 추출하여 전기영동하고 그 결과를 Fig. 5에 함께 제시하였다. (주)Bionics에 분리균주들의 major 밴드의 염기서열 분석을 의뢰하고 그 결과를 NCBI의 BLAST N program으로 비교하였을 때, 본 바다목장의 분리균주는 모두 Genebank에 등록된 *V. alginolyticus*의 IGS 염기서열(accession number: AY601670.1)과 99% 이상의 상동성을 나타내었으므로 *V. alginolyticus*로 동정하였다.

Table 2에 제시한 바와 같이 전남 다도해 바다목장의 비브리오속 세균 군집의 종조성은 *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* 및 *V. cholerae*

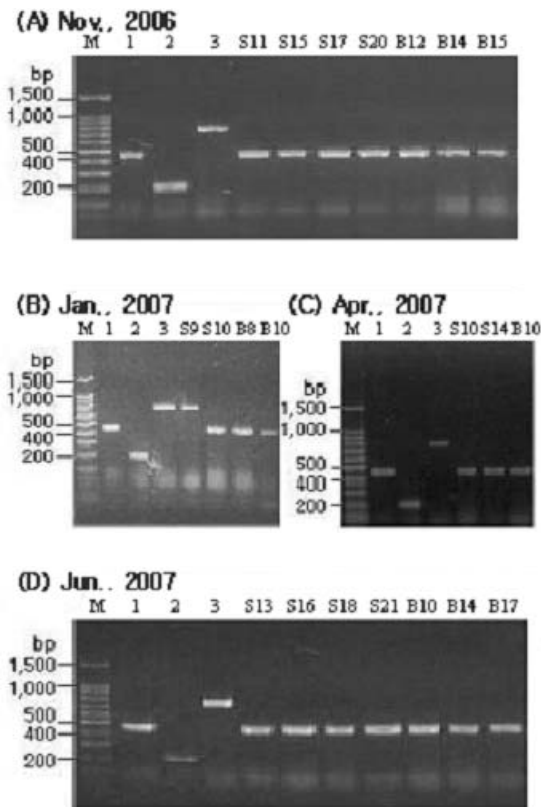


Fig. 4. Electrophoresis of multiplex PCR products for the strains isolated from the sea water samples. M; 100 bp ladder(Promega); lane 1, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; lane 2, *V. vulnificus* ATCC 25922; lane 3, *V. cholerae* ATCC 25920; S series, strains isolated from the surface sea water; B series, strains isolated from the bottom sea water

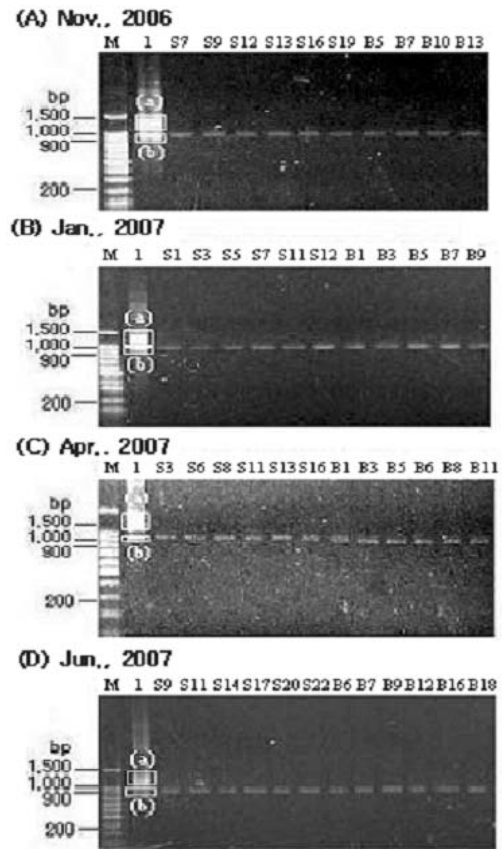


Fig. 5. Electrophoresis of 16S~23S rDNA IGS-PCR products for the strains isolated from the sea water samples. M; 100 bp ladder(Promega); lane 1, *V. alginolyticus* ATCC 17749; S series, strains isolated from the surface sea water; B series, strains isolated from the bottom sea water

non-01의 3종으로 구성되어 있었고, 4계절 모두 분포한 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*가 우점종으로 밝혀졌다.

본 연구에서 *V. vulnificus*나 *V. fluvialis*는 전혀 검출되지 않았으며, *V. alginolyticus*는 겨울(2007년 1월) 일부 정점을 제외한 대부분의 정점에서 4계절 연중 검출되었고, 조사 기간 중 모든 정점에서 *V. alginolyticus*의 검출 비율이 *V. parahaemolyticus*보다 더 높았다. *V. parahaemolyticus*는 정점 8에서만 4계절 모두 검출되었으므로 *V. alginolyticus*가 *V. parahaemolyticus*보다 해수온도의 변화에 덜 민감한 종으로 조사되었다. Son *et al.*(2005)은 우리나라 남해안 어류양식장에서 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*를 우점종으로 보고하였고, Choi and Tak(1991)은 동해안 강구지역 해수와 해니에서 *V. alginolyticus*가 *V. parahaemolyticus*보다 더 많이 검출되었으며 *V. alginolyticus*는 온도가 낮은 겨울철에도 분리되었다고 보고한 바 있다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 06 전남 다도해형 바다목장화 연구용역(생물군집 특성 연구)에 의하여 수행되었습니다.

요약

2006~2007년 전남 다도해 바다목장 내 9개 정점을 대상으로 표층수와 저층수에서 비브리오속 세균의 개체수를 측정하고, 군집의 종조성 및 우점종을 분석하였다. 계절별 비브리오속 세균의 개체수는 여름(2007년 6월) 표층수에서 5.4~93.2 cfu · ml⁻¹, 저층수에서 1.0~53.1 cfu · ml⁻¹로 4계절 중 가장 많이 검출되었으며, 해수온도가 낮은 겨울(2007년 1월)의 경우에는 1개 정점의 표층수에서만 0.2 cfu · ml⁻¹의 비브리오속 세균이 검출되었다. 봄(2007년 4월) 조사에서 표층수는 0~11.9 cfu · ml⁻¹, 저층수에서 0~8.3 cfu · ml⁻¹,

가을(2006년 11월) 조사의 표층수는 0.1~21.4 cfu · ml⁻¹, 저층수에서는 0~2.9 cfu · ml⁻¹의 비브리오속 세균이 검출되었다. 비브리오속 세균 군집의 종조성은 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* 및 *V. cholerae* non-01으로 조사되었으며, *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*가 4계절 모두 분리되어 우점종으로 나타났다. *V. alginolyticus*는 수온이 낮은 겨울에도 대부분의 정점에서 분리되어 다른 비브리오속 세균에 비하여 온도에 덜 민감한 종인 것으로 조사되었다.

참고문헌

- Baffone, W., Vittoria, E., Campana, R., Citterio, B., Casaroli A. and Pierfelici, L.: Occurrence and expression of virulence-related properties by environmental halophilic *Vibrio* spp. *in vitro* and *in vivo* systems. *Food Control*, 16: 451-457, 2005.
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. Y., Vickery, M. C. L., Jones, D. D. and Kaysner, C. A.: Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Med.*, 36: 215-222, 1999.
- Byun, K. D., Lee, J. H., Lee, K. J. and Kim, S. J.: Rapid and specific detection of virulent *Vibrio vulnificus* in tidal flat sediments. *Kor. J. Microbiol.*, 41: 178-176, 2005.
- Charles, A. K. and DePaola, J. A.: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and Other *Vibrio* spp. In: *Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed., revision A(1998), Ch. 9. 2004.
- Choi, Y. J. and Tak, R.: Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in marine environments during winter season. *Kor. J. Pub. Health.*, 15(3): 219-230, 1991.
- Eddy, S. D. and Jones, S. H.: *Microbiology of sum-*

- mer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture*, 211: 9-28, 2002.
- Hijarrubia, M. J., Lazaro, B., Sunen, E. and Fernandez-Astorga, A.: Survival for *Vibrio vulnificus* under pH, salinity and temperature combined stress. *Food Microbiol.*, 13: 193-199, 1996.
- Jung, K. J. and Shin, S. U.: Bacterial flora of East China sea and Yosu coastal areas, 1. Horizontal distributions according to number of bacteria, *Vibrio* spp. and coliform group. *J. Kor. Fish. Soc.*, 29, 9-16, 1996.
- Kang, B. J.: A study on the characteristics of bacteria isolated from cultured flouders(*Paralichthys olivaceus*) showing disease symptoms in Jeju area of Korea. Jeju Natl. Univ. Ph.D. thesis. 2003.
- Kim, S. M., Won, K. M., Woo, S. H., Li, H., Kim, E. J., Choi, K. J., Cho, M. Y., Kim, M. S. and Park, S. I.: Vibrios isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J. Fish Pathol.*, 18: 133-145, 2005.
- Lee, H., Oh, Y. H., Park, S. G. and Choi, S. M.: Antibiotic susceptibility and Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the seafood. *Kor. J. Environ. Health.*, 33(1): 16-20, 2007.
- Lee, S. K. Y., Wang, H. Z., Law, S. H. W., Wu, R. S. S. and Kong, R. Y. C.: Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers(IGSs) of marine vibriosis for species-specific signature DNA sequences. *Mar. Poll. Bull.*, 44: 412-420, 2002.
- Nhung, P. H., Shah, M. M., Ohkusu, K., Hata, M. N. H., Sun, X. S., Iihara, H., Goto, K., Masaki, T., Miyasaka, J. and Ezaki, T.: The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Syst. Appl. Microbiol.*, 30: 309-315, 2007.
- Panicker, G., Douglas, R. C., Melissa, J. K. and Bej, A. K.: Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 7436-7444, 2004.
- Raghunath, P., Karunasagar, I. and Karunasagar, I.: Evaluation of an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe for detection and enumeration of *Vibrio* spp. from shrimp hatchery environment. *Mol. and Cell. Probes*, 21: 312-315, 2007.
- Shin, S. U, Jeong, W. W., Kang, T. J. and Kang, S. K.: Studies on seasonal variation of the bacterial flora in sea-water of Kamak bay, 1. On the pathogenic *Vibrio* and *Salmonella*. *Bull. Mar. Sci. Inst.*, 1: 29-37, 1992.
- Son, K. T, Oh, E. G., Lee, T. S., Lee, H. J., Kim, P. H. and Kim, J. H.: Antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from farms on the southern coast of Korea. *J. Kor. Fish Soc.*, 38: 365-371, 2005.
- Stabili, L., Acquaviva, M. I. and Cavallo, R. A.: *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water Res.*, 39: 469-477, 2005.
- Su, Y. C. and Liu, C.: *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol.*, 24: 549-558, 2007.
- Thompson, F. L., Austin, B. and Swings, J.: *The Biology of Vibrios*. Amer. Society for Microbiology. 1st ed, pp. 384, 2006.

Manuscript Received : July 30, 2007

Revision Accepted : September 27, 2007

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung
(Pukyong Univ.)