J. Fd Hyg. Safety 15(2), 128–136 (2000)

수입냉동 어패류에 오염되어 있는 *Vibrio*속 세균의 분리 및 동정

윤영준 · 김도연 · 이실한 · 이우윤 · 고영환* · 김승곤 · 김정완†**

*인천대학교 생물학과 · *제주대학교 식품공학과 · **서울보건대 임상병리학과*

Isolation and Identification of *Vibrio* Species Contaminated in Imported Frozen Seafoods

Young-Jun Yoon, Do-Yeon Kim, Cil-Han Lee, U-Yoon Lee, *Young-Hwan Koh, **Seoug-Kon Kim, and Jung-Wan Kim†

Dept. of Biology, University of Inchon, Inchon, 402-749

**Dept. of Food Science and Technology, Cheju University, Cheju, 690-756*

***Dept. of Medical Technology, Seoul Health College, Korea.*

ABSTRACT – Twenty-four *Vibrio* strains were isolated from imported frozen seafoods and identified according to their physiological and biochemical properties. They included two *V. cholerae* non-O1 sp., two *V. diazotrophicus* sp., one *V. hollisae* sp., five *V. natriegens* sp., eight *V. fluvialis* sp., and four *V. nereis* sp.. Two of them were not identified as *Vibrio* species. When these strains were tested using API-20E kit for identification, however, only the results for two *V. cholerae* and five of the *V. fluvialis* strains matched the results obtained previously. Due to the importance of detecting *V. cholerae* from foods, phylogenetic identification of the strains was attempted based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S rDNAs amplified by PCR. The results suggested that the two strains had identical RFLP patterns which were more closely related to that of *V. proteolyticus* than *V. cholerae*. The problems associated with identification of pathogens originated from seafoods demand development of accurate and rapid identification methods.

Key words □ *Vibrio*, Imported frozen seafoods, API-20E kit, 16S rRNA, PCR, RFLP

*Vibrionaceae*과는 해양생물상 (marine flora)에서 가장 중요한 세균군의 하나로 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* 와 *Plesiomons* 등의 속이 있으며,[1] 해수나 플랑크톤 혹은 어류의 장내에 가장 많이 서식하는 세균이다. 서태평양에서 수행된 연구결과에 의하면, 해수면에 있는 세균의 약 80%가 vibrios라고 한다.[2] *Vibrionaceae*과에 속하는 일부 세균은 인간과 동물에 대해 병원성을 나타내는데, 특히 *Vibrio* 속 세균은 항혈청 O1과 응집 반응하는 *V. cholerae*와 *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 등 사람에게 콜레라, 패혈증 및 장염증세 등 질병을 유발시켜 임상적으로 중요하게 분류되고 있다.[3]

*Vibrio*속은 여름 장마철에 해수의 온도가 20℃ 이상으로 상승했을 때 신속히 증식하여 해수나 어패류의 장관 내에 기생하므로 어패류의 생식이 주된 감염경로가 되며, 때로 상처를 통해 감염되기도 한다. *Vibrio*속 세균들의 최적 생장온도 범위는 25~37℃로 이들로 오염된 수산식품을 실온에 방치시키면 급속하게 증식할 수 있으며 또한 어패류나 기타 수산 식품을 냉장이나 냉동 조건에서 저장할 때에도 휴면 상태로 존재하는 등 쉽게 사멸되지 않는다.[4] 최근, 농수산물 시장이 개방되어 외국으로부터 수입된 다양한 냉동식품과 수산식품 등의 소비량이 증대되면서 쇠고기, 닭고기 및 피자 등에서 *E. coli* O157 : H7, *Listeria*와 *Yersinia*와 같은 식중독의 원인이 되는 병원균이 발견된 바 있으며, 이들 외에 *Vibrio*속 균에 의한 식중독 등 집단발병의 가능성도 무시할 수 없는 것으로 사료된다. 따라서 *Vibrio*균을 비롯한 수입냉동식품에 오염되어 있는 병원균들의 신속하며 정확한 검색과 동정이 국민 보건 및 외국과의 냉동식품 통상에 있어서 매우 중요한 과제가 될 것이다.

전통적인 생리, 생화학적 특성검사에 의존하는 병원성 미생물의 검색 방법은 세균의 순수분리 및 동정에 시간이 오

†Author to whom correspondence should be addressed.

래 걸릴 뿐만 아니라 많은 노동력과 비용이 소요되어 효율적인 전염병 예방과 치료에 걸림돌이 되고 있다. 특히 *Vibrio*속의 경우 자연시료에서 분리되는 세균의 생화학적 특성의 다양성으로 인하여 정확한 동정에 많은 어려움이 따르게 되고 연구자마다 다른 분류기준을 적용하여 30종 이상으로 분류하기도 하며[5-7] 최근의 Bergey's Manual에는 약 35종이 기재되어 있다.[8] 따라서 이러한 단점을 극복하기 위하여 API-20E kit 등 상업화된 검색 kit를 사용하는 방법이 널리 사용되고 있다. 그러나, 이러한 kit는 주요 임상 병원균으로 분류되어 있는 8종의 *Vibrio*속 세균을 중심으로 검사가 이루어지도록 고안되어 있어 그 사용범위에 제한이 있을 것으로 예측된다.

본 연구에서는 수입 냉동수산식품 등에 어떠한 *Vibrio*속 균들이 오염되어 있는 지를 검사하고 분리된 균들에 대하여 생리, 생화학적 특성검사와 API-20E kit를 이용하여 동정하여 그 두 결과간의 차이점을 비교하고 정확한 동정에 있어서의 문제점을 분석하였으며, 보다 신속하며 정확하게 검색하기 위한 방안으로서 *Vibiro*속 균주들의 16S rRNA 유전자 부위에 대한 제한효소길이다형성(Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)분석법 도입을 제안하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용한 시료는 1996년 12월부터 1997년 2월까지 경인 지역의 대형 백화점에서 연어 (노르웨이산), 날치알 (태국산), 대하 (태국산), 해삼 (인도양산), 등 수입 냉동어패류를 구입하여 확보하였다.

*Vibrio*균의 분리

수집한 수입 냉동어패류들에 오염되어 있는 *Vibrio*균을 분리하기 위하여 표피, 내장과 아가미 등의 부위를 멸균된 면봉으로 문지르거나 작게 썰은 조각을 yeast extract broth [YEB; NaCl, 2.34% (w/v); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.23%(w/v); $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.0075% (w/v); KCl, 0.075% (w/v); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.145% (w/v); NH_4Cl, 0.1% (w/v); tris(hydroxymethyl) aminomethane, 0.61% (w/v); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.028%(w/v); yeast extract, 0.5% (w/v)]에 접종하여 3-4시간 배양하였다. 이렇게 증균시킨 배양액은 연속희석법을 이용하여 10^{-3}–10^{-5}까지 희석한 다음 thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose agar (TCBS; Difco, USA.)배지[9]나 1.5% 한천을 포함하는 YE 평판배지(YEA)에 도말하여 20°C에서 18-24시간 배양하였다.

*Vibrio*균의 순수분리 및 동정

TCBS 배지 상에서 생장한 노란색과 초록색 집락의 균주들을 대상으로 하여 방사적 접종 방법으로 순수 분리하였으며, YEA배지에서 증식시킨 균주는 집락의 형태, 크기 및 색깔을 구별하여 TCBS 배지에 접종한 후 노란색과 초록색의 집락으로 생장한 균주들을 순수 분리하였다. 분리된 균주들은 Bergey's Manual[8]과 FDA manual[10]에 의거하여 세포의 형태, 운동성, 유주현상 (swarming), oxidase, nitrate 환원, MR-VP, esculin, arginine dihydrolase, 당 이용능, 가수분해효소, triple sugar iron, 내염성 (0-10% NaCl), 내온성 (4-43°C) 등을 시험하여 동정하였다.

API-20E kit를 이용한 *Vibrio*균의 동정

Vibrio 균으로 동정된 균을 확인하기 위해서 API-20E kit (Bio Mericux Co., France)를 손[11] 등이 실험한 방법을 변형하여 사용하였다. YEA 배지 상에서 15-18시간 동안 배양된 1-2개 집락을 취하여 2.0% NaCl이 첨가된 5 ml의 멸균 증류수으로 희석한 다음 API-20E kit에 접종하여 37°C에서 15-24 시간 배양하면서 kit 내 반응액의 색깔 변화를 기록하였다. tryptophane deaminase (TDA), indole production (IND)와 acetoin production (VP)에는 지시약을 1-2방울 점적한 후 색의 변화로 반응을 기록하였다.

PCR에 의한 16S rRNA 유전자의 증폭

3% NaCl을 포함하는 4.0 ml LB 배지에 *Vibrio* 균주 (IMLS1, IMLS2, *V. cholerae* ATCC25872, *V. proteolyticus* ATCC15338)를 접종한 후 30°C 배양기에서 하룻밤 배양한 다음 1.5 ml 원심관에 각각 1.5 ml씩 옮겨 12,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포를 침전시키고, 상층액을 제거한 다음 100 μl의 3차 증류수를 첨가하였다. -70°C와 37°C에서 냉동과 해동을 3-4회 반복한 다음 미세원심분리기로 12,000 rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 침전물을 20 μl의 살균된 3차 증류수에 최종적으로 현탁시켰다.[12] PCR 반응은 Shirai 등[13]이 보고한 내용을 다음과 같이 변형시켜 실행하였다. PCR 반응을 위한 주형 DNA를 1 ng/μl의 농도로 하고, 50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)이 포함된 PCR bufferII (Perkin-Elmer Cetus Co., Norwalk, U.S.A.), 200 μM dNTPs (Perkin-Elmer Cetus), 0.4 μM의 primer들 (Universal primers; fU1, 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGGC-TCAG-3'; rP1, 5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'; Bioneer Co., Korea), 25 mM $MgCl_2$, 5.0 U/μl AmpliTaq (Bioneer Co., Korea)를 넣어 최종 반응액의 부피가 50 μl가 되도록 하였다. PCR를 실행하기 위해서 반응 혼합액을 GeneAmp

PCR System 2400 (Perkin Elmer Cetus, USA.)에 넣어 초기에 95℃에서 5분 동안 변성시킨 다음 변성 (94℃, 1분), 재결합 (65℃, 1½분), 중합반응 (72℃, 2분)을 40회 동안 반복시킨 후 72℃에서 5분 동안 마무리 반응시켰다.

*Vibrio*속 균주의 RFLP

PCR로 증폭된 16S rRNA 유전자를 전체 반응액이 25 μl가 되도록 하여 10종의 제한효소 (*Alu* I, *Hae*III, *Hha* I, *Hinf*I, *Hsp*92II, *Mbo*I, *Msp*I, *Pst*I, *Rsa*I과 *Taq*I; BRL, USA.)를 사용하여 절단하였는데, *Taq*I은 65℃, 기타 제한효소들은 37℃에서 1-2시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 2.0% (w/v) agarose gel 상에서 전기영동하여 전개된 RFLP를 관찰하였다.[14] *Vibrio*속 세균의 RFLP는 Genbank (Mountain View, USA.) database에서 16S rRNA의 염기서열을 찾아 DNASIS (IBI, USA.)로 분석하였다.

결과 및 고찰

*Vibrio*균의 분리

수입 냉동 어패류 시료에서 순수 분리된 *Vibrio*균은 해삼에서 11주, 연어에서 7주, 날치알에서 4주, 대하에서 2주 등 총 24주이었으며 그들의 형태적 특성 및 운동성, TCBS 한천배지 상의 집락색깔 등을 Table 1에 요약하였다. 분리된 균주들은 Bergey's Manual에 명시된 *Vibrio*의 형태적 특징을 모두 갖추고 있었다. 즉, Gram 음성 간균으로 직쇄상 혹은 약간 구부러진 모양을 갖고 있었고 또한 운동성을 관찰할 수 있었다. 그러나, *V. alginolyticus*와 *V. proteolyticus* 등 2종만 갖고있는 것으로 보고된 유주현상은 분리된 24주에서는 관찰되지 않았다 (Table 1).

Table 1. Morphological characteristics of the *Vibrio* strains isolated from imported frozen seafoods.

Strains	Gram staining	Shape[a]	Motility	Color on TCBS[b]
IMSC 1-1	−	C	+	G
IMSC 1-2	−	C	+	Y
IMSC 1-3	−	C	+	Y
IMSC 1-4	−	S	+	G
IMSC 2-1	−	C	+	Y
IMSC 2-2	−	S	+	Y
IMSC 2-3	−	S	+	Y
IMSC 2-4	−	S	+	Y
IMSC 3-1	−	S	+	Y
IMSC 3-2	−	S	+	Y
IMSC 3-3	−	C	+	Y
IMFS 1-1	−	S	+	Y
IMFS 1-2	−	S	+	Y
IMFS 2-1	−	S	+	Y
IMFS 2-2	−	S	+	Y
IMLS 1	−	S	+	Y
IMLS 2	−	S	+	Y
IMSL 1-1	−	S	+	Y
IMSL 1-2	−	C	+	Y
IMSL 2-1	−	S	+	Y
IMSL 2-ⓐ	−	S	+	Y
IMSL 2-ⓑ	−	C	+	Y
IMSL 2-ⓒ	−	C	+	Y
IMSL 2-ⓓ	−	C	+	Y

[a] S, Straight rod; C, Curved rod
[b] G, Green; Y, Yellow

생리,생화학적 특성을 이용한 *Vibrio*균의 동정

윤 등[15]이 한국연안의 해수와 해토 및 어패류에 존재하는 *Vibrio*의 분포도를 검사하기 위하여 Bergey's Manual에 의거하여 작성한 바 있는 검색표를 따라 이들의 생리, 생화학적 특성을 분석한 결과는 Table 2에 보인 바와 같았다. Alsina와 Blanch는[16] *Vibrio*종의 검색을 위하여 29가지 실험을 포함하는 검색표를 작성하였고 이 중 10가지 실험 결과만으로도 충분히 종의 수준에서 동정이 가능함을 보인 바 있다.[17] 그러나, 자연시료에서 분리되는 *Vibrio*균의 경우 매우 다양한 생화학적 특성을 보이기 때문에 정확한 동정에 많은 문제가 있음이 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있다.[6,18-20] 본 연구에서도 수입 냉동수산식품에서 분리된 균주들이 매우 다양한 생리·생화학적 특성을 보여 동정에 어려운 점이 많았는데, 주로 Bergey's Manual에 의거한 검색표와 Alsina와 Blanch의 검색표를 참고로 하여 수행한 실험 결과 중 같은 종 내에서도 변이가 관찰되었다는 보고가 있을 경우에는 특성이 조금씩 다르더라도 같은 종으로 분류하였다.

분리된 총 24주 가운데 IMLS1과 IMLS2 2주는 *V. cholerae*로 동정되었고, 그 외 *V. fluvialis* 8주, *V. natriegens* 5주, *V. nereis* 4주, *V. diazotrohicus* 2주, *V. hollisae* 1주 등으로 나타났다 (Table 3). 동정되지 않은 2주는 nitrate reduction에 대해서 양성반응을 나타내고, oxidase 실험에 대해서는 음성반응을 보이는 등 *Vibrio*속에서는 관찰되지 않는 특성들을 보여 *Vibrio*속 내 어떤 종으로도 동정할 수가 없었다. 이러한 결과는 윤 등[15]이 한국연안의 *Vibrio*속 분포도를 조사하여 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* (각 16%), *V. fluvialis*, *V. harveyi* (각 12%), *V. nereis* (11%), *V. metschnikovii* (8%), *V. vulnificus* (6%), *V. proteolyticus* (5%)를 비롯한 총 14종의 *Vibrio*속을 보고한 것과는 많은 차이가 있는 것으로 나타났다. 특히, 사람에게 병원성을 보이는 균으로서는 유일하게 검출된

Table 2. Biochemical tests of the *Vibrio* strains isolated from imported frozen seafoods.

Characteristics \ Strains	IMSC										
	1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	2-4	3-1	3-2	3-3
Oxidase	_	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	-	-	-	-	D	-	-	d	-	+	-
TSI	K/A[c]	K/A	K/A	A/A	A/A	K/K	K/A	K/A	K/A	A/A	K/K
Arginine dihydrolase	-	+	+	-	|	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Acid from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Acid from arabinose	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of											
Starch	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Production of H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in NaCl											
0%	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
8%	+	D	+	+	d	+	+	D	D	-	D
10%	-	-	D	D	-	-	-	d	d	-	d
Growth at											
4℃	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-
20℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+

Table 2. (continued)

Characteristics \ Strains	IMFS				IMLS					IMSL			
	1-1	1-2	2-1	2-2	1	2	1-1	1-2	2-1	2-ⓐ	2-ⓑ	2-ⓒ	2-ⓓ
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	—
Esculin hydrolysis	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	—
TSI	K/A	A/A	A/A	K/A	A/A	A/A	A/A	A/A	K/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Arginine dihydrolase	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Acid from arabinose	-	+	+	+	D	D	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of													
Starch	-	-	-	-	+	+	-	-	-	D	-	-	-
Lipase	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Production of H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in NaCl													
0%	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
8%	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
10%	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at													
4℃	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
15℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43℃	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-

D, different reactions in different taxa; d, 11-89% of strains are positive; slant/butt K-red, A-yellow; +, 90% or more of strains are positive; -, 10% or less of strains are negative

Table 3. API-20E kit analysis of the Vibrio strains isolated from imported frozen seafoods.

Strains	IMSC										
Test	1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	2-4	3-1	3-2	3-3
ONPG	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
ADH	-	+	+	-	±	±	±	+	+	+	±
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	+	−	±	-	-	-	-	-	
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±
IND	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
V-P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
MAN	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	±	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
ARA	-	-	+	-	-	+	±	+	-	-	-
OX	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

*V. cholerae*는 혈청검사 결과 non-O1으로 나타났으나 냉동수산식품에서 이러한 종이 검출된 것은 앞으로 냉동식품의 병원균 검색이 중요한 문제임을 시사하는 것으로 사료되어 그 결과의 정확성을 API-20E kit을 사용하여 검증하고자 하였다.

API-20E kit를 이용한 *Vibrio*균의 동정

제조사에 의해 주로 임상학적 시료의 병원성 세균 동정에 사용하도록 고안되었으나, 해양시료에 존재하는 세균의 동정에도 보편적으로 사용되고 있는 API-20E kit를 이용하여[21-23] 수입 냉동수산식품에서 분리한 24 균주들을 시험한 결과를 Table 4에 요약하였으며 이를 토대로 제조사에서 제공하는 프로그램을 이용하여 동정한 결과는 Table 5에 보인 바와 같다. 손 등[11]이 제조사에서 제안한 염농도 (0.85% NaCl)를 가진 희석액을 사용했을 때와 *Vibrio*속 세균의 생장에 적절한 염농도 (2% NaCl)를 가진 희석액을 사용했을 때 후자가 더 정확한 동정결과를 보였음을 참고로 하여 2% NaCl을 포함하는 희석액을 사용하여 시험한 결과는 실험실 내에서 직접 여러 배지를 제조하여 수행한 생리·생화학적 시험 결과와 VP시험, arginine dihydrolase 시험 및 산 발효시험에서 다소 차이를 보였다. 특히 API-20E kit에 포함된 산 발효 실험의 경우 포도당과 mannitol 발효를 제외하고는 반응이 거의 나타나지 않았다. 또한 kit에서 일어난 반응은 18-24시간 후에 그 결과를 판정하도록 제시하고 있

Table 3 (continued)

Strains	IMFS				IML		IMSL						
Test	1-1	1-2	2-1	2-2	1	2	1-1	1-2	2-1	2-ⓐ	2-ⓑ	2-ⓒ	2-ⓓ
ONPG	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	+	+	-	-	-	±	+	±	-
V-P	-	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+
GEL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-
MAN	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ONPG, ortho-nitro-phenyl-galactoside DH, arginine dihydrolase
LDC, lysine decarboxylase ODC, ornithine decarboxylase
CIT, citrate utilization H_2S, H_2S production
URE, urease TDA, tryptophane deaminase
IND, indole production V-P, Voges-Proskauer
GEL, gelatinase GLU, glucose
MAN, mannitol INO, inositol
SOR, sorbitol RHA, rhamnose
SAC, sucrose MEL, melibinose
AMY, amygdalin ARA, arabinose
OX, oxidase
+, 90% or more of strains are positive ; −, 10% or less of strains are negative

Table 4. Identification of the *Vibrio* strains by various physiological and biochemical tests.

Strains Identified	Putative *Vibrio* Isolates
V. cholerae non-O1	IMLS 1, IMLS 2
V. diazotrophicus	IMSC 1-3, IMSC 2-3
V. hollisae	IMFS 1-1
V. fluvialis	IMSC 1-2, IMSC 2-1, IMSC 2-2, IMSC 2-4, IMSC 3-1, IMSC 3-2, IMSC 3-3, IMSL 2-ⓐ
V. natriegens	IMSL 1-1, IMSL 1-2, IMSL 2-1, IMSL 2-ⓓ IMFS 2-2
V. nereis	IMSL 2-ⓑ, IMSL 2-ⓒ, IMFS 1-2, IMFS 2-1
Unidentified	IMSC 1-1, IMSC 1-4

Table 5. Identification of the *Vibrio* strains by using API-20E kit.

Strains Identified	Putative *Vibrio* Isolates
V. cholerae non-O1	IMLS 1, IMLS 2
V. fluvialis	IMSC 1-2, IMSC 2-4, IMSC 3-1, IMSC 3-2, IMSC 3-3
Non-*Vibrio*	IMSC 1-3, IMSC 2-3, IMFS 1-1, IMSC 2-1, IMSC 2-2, IMSL 2-ⓐ, IMSL 1-1, IMSL 1-2, IMSL 2-1, IMSL 2-ⓓ, IMFS 2-2, IMSL 2-ⓑ, IMSL 2-ⓒ, IMFS 1-2, IMFS 2-1, IMSC 1-1, IMSC 1-4

는데 본 실험에서는 6-8시간 이내에 반응 결과가 나타나기 시작하여 일정 시간이 지나면 다시 염기성으로 변화되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 반응이 나타난 후 일정시간이 경과한 다음에 판정하는 것에는 문제점이 있는 것으로 사료되었다. 또한 VP 시험은 배지의 pH 조건이나 배양 시간에 따라서 결과가 다르게 나타날 수 있다고 알려져 있고 API-20E kit에서는 18-24시간 사이에 결과를 판정하나 본 실험실에서 VP 배지를 제조하여 반응 결과를 48시간 배양 후 확인했기 때문에[24] 동일한 결과가 나타나지 않는 것으로 사료되었다. arginine dihydrolase 시험에서도 서로 다른 결과가 나타났으며 동일 균주에 대해서 API-20E kit로 재실험한 경우에도 실험에 따라 결과가 다르게 판정되기도 하였다.

API-20E kit를 사용하여 24 균주의 특성을 재분석한 결과 *V. cholerae* (IMLS 1과 2)와 *V. fluvialis* (IMSC 1-2, 2-4, 3-1, 3-2와 3-3) 등 2종의 *Vibrio*만 분석되었는데 (Table 5), 이상의 7주는 생리·생화학적 실험으로 동정한 결과와 동일하게 나타났다. 나머지 17주는 분석 kit에 있는 생화학 반응액과 반응을 보이지 않았거나 일부 일어난 반응결과에 의하면 *Vibrio*속 균주가 아닌 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Proteus*속일 가능성이 높은 것으로 판정되었다. *V. cholerae*로 판명된 2주는 ortho-nitro-phenyl-galactoside (ONPG) 시험에서 양성 반응을 나타낸 경우로 API-20E kit에서 이 반응이 양성 반응을 보이는 균주는 *V. cholerae*로 동정되는 확률이 높은 것으로 나타났으며 *A. sorbia*일 가능성도 높다고 분석되었다. 많은 균주가 동정되지 않은 이유는 제조사에 의해서 공급되는 분석용 프로그램이 8가지의 주요 병원성 *Vibrio* 균주들을 중심으로 분석하도록 고안되었기 때문이며 따라서 그 사용 범위가 매우 제한됨을 알 수 있었다.

RFLP를 이용한 IMLS1과 IMLS2 균주의 동정검증

생리·생화학적 실험과 API-20E kit를 이용하여 수입 냉동어패류에서 분리한 24주의 *Vibrio* 균 가운데 병원균인 *V. cholerae*로 밝혀진 2 균주가 정확하게 동정되었는지를 확인하기 위하여 16S rRNA 유전자를 증폭한 뒤 10종의 제한효소를 이용하여 RFLP 분석을 수행하였다. 그 결과, *V. cholerae*로 동정되었던 2주는 생리·생화학적 특성이 조금 달랐음에도 불구하고 RFLP 양상은 서로 동일하였으나 *V. cholerae*나 *A. sorbia*의 RFLP들과는 매우 다른 양상을 보였으며 오히려 *V. proteolyticus*의 RFLP에 전반적으로 가까운 양상을 보였다 (Figure 1; Table 6). 특히 사용한 10종의 제한효소 가운데 *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*으로 절단했을 때 *V. cholerae*나 *A. sobria*의 RFLP와는 구별되면서 *V. proteolyticus*의 RFLP와 유사한 양상을 보였다. Kita-

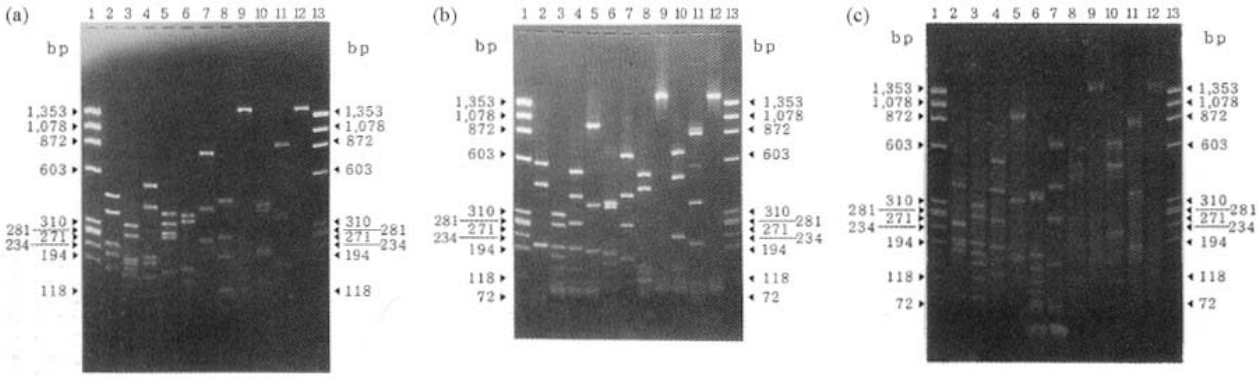

Fig.1. RFLP of 16S rRNAs from *V. cholerae* (A), *V. proteolyticus* (B), and IMLS1(C). 16S rDNAs amplified from three *Vibrio* species were digested with ten restriction enzymes and their restriction patterns were compared on 2% agarose gel. Lanes 2 were loaded with 16S rDNA digested with *AluI*; lanes 3, *HaeIII*; lanes 4, *HhaI*; lanes 5, *HinfI*; lanes 6, *Hsp92II*; lanes 7, *MboI*; lanes 8, *MspI*; lanes 9, *PstI*; lanes 10, *RsaI*; lanes 11, *TaqI*; lanes 12, no enzyme. Lanes 1 and 13 were loaded with a size maker, ϕX174DNA digested with *HaeIII*.

Table 6. RFLPs of *V. cholerae*, *V. proteolyticus*, IMLS1, and *A. sobria* 16S rRNAa.

Strains \ Enzyme	*AluI* AGCT	*HaeIII* GGCC	*HhaI* GCGC	*HinfI* GANTC	*Hsp92II* CATG	*MboI* GATC	*MspI* CCGG	*PstI* CTGCAG	RsaI GTAC	*TaqI* TCGA
V. cholerae	381,351,246 211,175	317,278,204 195,167	531,356,219 197,160	336,291 276,216	370,342 182,150	502,400 266,258	443,279 216	-[b]	433,401 234,223	899,361
V. proteolyticus	572,394,207 188	317,278,204 177,166	531,383 217,197	942,340	370,352 182,150	652,400 276,	513,443	-	667,503 234	863,361
IMLS1	565,380,205 190	298,260,200 175,160	496,354 256,190	885,317 175	338,324 180,150	615,370 260,165	470,400	-	625,470 228	833,338 192
A. sobria	211,207,195 180,174,173 166	317,220,204, 171,169,161	578,531 166	349,338 317,245,	552,344 209,150	601,400 154,152	408,206	-	892,357	682,361

a) The lengths of restriction fragments generated by restriction are represented in base pairs (bp).
Only the restriction fragments larger than 150bp are listed.
b) no restriction site present

Tsukamoto[25] 등은 *Vibrionaceae*과에 속하는 해양세균들의 분류계통학적 연관성을 이들의 16S rRNA의 염기서열을 비교하여 그 유사도에 따라 분석하였으며 이 때 *V. cholerae*와 *V. proteolyticus*는 *Vibrio*속 내에서 서로 유사도가 비교적 낮은 것으로 분류된 바 있다. 본 실험실에서 *Vibrionaceae*과 세균들의 16S rRNA 염기서열을 토대로 이들의 제한효소 10종에 대한 RFLP를 분석하여 생성되는 단편길이와 단편 수를 중심으로 neighbor joining method을 사용하여 분류한 결과도 위의 16S rRNA의 염기서열을 사용했을 때와 동일하게 나타났다 (논문 준비 중). 또한 본 실험실에서 개발한 *V. cholerlae*의 종 특이적 16S rRNA 유전자 probe나 콜레라 독소 유전자 probe에 의해서 이 두 균주의 염색체 DNA로부터 어떠한 단편도 증폭되지 않는 것을 알 수 있었다.[26] 따라서 이 두 균주는 *V. cholerae* 균이 아닌 것으로 사료되며, 이러한 주요 병원균의 검색에 있어서 기존의 생리,생화학적 분석이나 간편한 kit를 사용할 때 오류를 범할 수 있음을 시사한다고 하겠다. 따라서, 수입냉동어패류를 비롯한 식품류의 병원성 세균의 오염을 신속하고 정확하게 검색할 수 있도록 최근 널리 연구되고 있는 종특이적인 유전자 probe를 이용한 PCR이나 RFLP를 이용한 검색 및 동정법의 개발이 필요하다고 사료된다.

국문요약

수입 냉동어패류에서 24주의 *Vibiro* 균주를 순수 분리하여 그들의 생리, 생화학적 특성에 따라 동정한 결과 *V. cholerae* non-O1과 *V. diazotrophicus*가 각 2주, *V. hollisae* 1주, *V. natriegens* 5주, *V. fluvialis* 8주, *V. nereis* 4주인 것으로 밝혀졌고 2주는 *Vibiro*속 균주가 아닌 것으로 나타났다. 이 균주들을 API-20E kit로 동정한 결과는 위의 결과와 매우 달라, *V. cholerae*로 동정된 2주와 *V. fluvialis*로 동정된 5균주의 경우에만 결과가 일치하였고 나머지는 *Vibrio*속이 아닌 것으로 분석되었다. 식품류에서 *V. cholerae*가 검출된 점에 주목하여 이 분리균들의 동정을 보다 정확히 하기 위하여 분리균들의 16S rRNA를 증폭시켜 이들의 RFLP를 분석하였다. 그 결과, *V. cholerae*로 동정된 두 균주는 동일한 RFLP양상을 갖고 있었으며, *V. cholerae*보다는 *V. proteolyticus*의 RFLP에 보다 가까운 것으로 나타났다. 따라서 식품류의 병원균 검색을 보다 정확하고 신속하게 할 수 있도록 효율적인 검색 방법의 개발이 시급하다고 하겠다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술개발사업(HMP-96-F-1-0003)과 인천대학교 교내연구비를 지원받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Farmer, J. J. and Hickman-Brenner, F. W. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. in The Procaryotes. ed. Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. pp 2952-3011. Springer Verlag, New York. (1992).
2. Simidu, U., Taga, N., Colwell, R, R., and Schwartz, J. R. Heterotrophic bacterial flora of the seawater from the Nansei Shoto (Ryukyu Retto) area. *Bull. Jpn. Soc. Sci, Fish.* **46**, 505. (1980).
3. Ostling, J., Louise, H., Flardh, K., Svenblad, B., Jouper-Jaan, A., and Kjelleberg, S. Starvation and Recovery of *Vibrio*. pp. 103-127. in Starvation in Bacteria (ed. S. Kjelleberg), Plenum Press, New York. (1993).
4. Kim, S., Park, U., Park, M., Kim, Y., Chang, D. Physiological and Ecological Characteristics of Hemolytic Vibrios and Development of Sanitary Countermeasure of Raw Fisheries Foods. 2. Physiological and Psychrotrophic Characteristics of *Vibrio mimicus* SM-9 Isolated from Sea Water. *J. Fd. Hyg. Safety.* **12**, 9-14. (1997).
5. Bryant, T. N., Lee, J. V., West, P. A., and Colwell, R. R. Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 437. (1986).
6. Austin, B. and Lee, J. V. Aeromonadaceae and Vibrionaceae. in Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology ed. Board, R. G., Jones, D., and Skinner, F. A. Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 29. Blackwell Scientific Publications. Oxford. (1992).
7. Farmer, J. J. and Hickman-Brenner, F. W. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. in The Prokaryotes. ed. Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. pp. 2952-3011. Springer Verlag. New York. (1992).
8. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. pp. 175-289. Williams and Wilkins, Baltimore. (1994).
9. West, P. A., Russek, E., Brayton, P. R., and Colwell, R. R. Statistical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose agars. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 1110. (1982).
10. Food and Drug Administration: Bacteriological Analytical Manual (7th ed.) Food and Drug Administration, U.S.A. (1992).
11. Shon, J. Y., Kim, Y. J., Lee, K. U., Yoo, J. C., and Park, M. S. Nonstaining Method for Determination of Gram Reactions and Comparison of Dilutes for Use of API-20E in Identification of Marine *Vibrios*. *Report of NIH Korea.* **22**, 195. (1985).
12. Velazquez, J. B., Casado, J., Sieiro, C., Calo, P., Longo, E., Villa, T. G. Improved lysis of wine lactobacilli for high yield isolation and characterization of chromosomal DNA. *J. of Microbiol. Methods.* **17**, 247. (1993).
13. Shirai, H., Nishibuchi, M., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Pal, S. C., and Takeda, Y. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *V. cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2517. (1991).
14. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. (1989).
15. Yoon, Y. J., Kim, J. W., Koh, Y. K., and Koh, Y. W. 연안해수 근원의 *Vibrio*속 세균의 다양성. 미생물과 산업, **22**, 193. (1996).
16. Alsina, M. and Blanch, A. R. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 70. (1994).
17. Alsina, M. and Blanch, A. R. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 719. (1994).
18. West, P. A., Brayton, P. R., Brayton, T. N., and Colwell, R. R. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. Int. *J. Syst. Bacteriol.* **36**, 531. (1986).
19. Masumura, K., Yasunobu, H., Okada, N., and Muroga, K. Isolation of a *Vibrio* sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathology* **24**, 135. (1989).
20. Ortigosa, M., Esteve, C., and Pujalte, M. J. Vibrio species in seawater and mussels-abundance and numerical taxonomy. Syst. *Appl. Microbiol.* **12**, 316. (1989).
21. Colwell, R. R., Kaper, J., and Joseph, S. W. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios : Occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* **190**, 394. (1977).
22. Kent, M. L. Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API-20E multitube test strips. Can. *J. Fish Aquat. Sci.* **39**, 1725. (1982).
23. Grisez, L., Ceusters, R., and Ollevier, F. The use of API-20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* **14**, 359. (1991).

24. Case, C. L., and Johnson, T. R. Carbohydrate metabolism in Laboratory experiments in microbiology. pp.51-55. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park. (1984).
25. Kita-Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K., and Simidu, U. Phylogenetic Relationships of Marine Bacteria, Mainly Members of the Family *Vibrionaceae*, Determined on the Basis of 16S rRNA Sequences. Int. *J. Syst. Bacteriol.* **43,** 8. (1993).
26. Yoon, Y. J. Thesis submitted for PhD degree. University of Inchon, Korea. (1999).